

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an Photosynthesezentren

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Physik
der Universität Regensburg

UBR069015243152

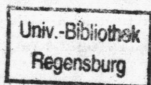


vorgelegt von
Nikolaus Schneeberger
aus Unterdegenbach

1993

D:93/ 177

200 / UH 5710 S 358 + 2



85045128

Das Promotionsgesuch wurde am 16.06.1993 eingereicht.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. W. Gebhardt.

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. G. Obermair (Vorsitzender)
Prof. Dr. W. Gebhardt (1. Gutachter)
Prof. Dr. A. Penzkofer (2. Gutachter)
Prof. Dr. H.-D. Lüdemann (Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Photosynthese	3
2.1	Photosyntheseapparat bei Pflanzen – Überblick	3
2.2	Antennen - Anregungsweiterleitung	6
2.2.1	Chlorophyll	6
2.2.2	Antennenorganisation	9
2.2.3	Theorie der Anregungsübertragung	10
2.3	Photosystem II	16
2.4	Photosystem I	21
2.4.1	Aufbau und Funktion	21
2.4.2	Transferzeiten	25
2.4.3	Gemeinsamkeiten von PS II und PS I	27
3	Proben	29
3.1	Algen und Cyanobakterien	29
3.1.1	Charakterisierung und Aufzucht	29
3.1.2	Probenherstellung	31
3.2	Chloroplasten	32
3.3	Photosystem I	32
3.3.1	Präparation	32
3.3.2	Probenherstellung	34
3.4	Inhibitoren und Redoxsubstanzen	36

4 Experimenteller Aufbau	37
4.1 Erzeugung kurzer Pulse mit einem Argonionenlaser	37
4.1.1 Modenkopplung	37
4.1.2 Variation der Wiederholrate mit einem Cavity-Dumper	39
4.2 Aufbau der optischen Komponenten	42
4.3 Datenerfassung bei Messungen im μs -Bereich	43
4.4 Signalerfassung im ps-Bereich	45
4.4.1 Zeit-Amplituden-Konversion und Histogrammierung	45
4.4.2 Constant-Fraction-Discriminator	47
4.4.3 Meßaufbau	48
4.4.4 Auswertung der Abklingkurven	49
5 Fluoreszenzspektroskopie an intakten Systemen	51
5.1 <i>Anabaena variabilis</i> (Cyanobakterien)	51
5.1.1 Fluoreszenzspektren	51
5.1.2 Abklingkurven im sub-ns-Zeitbereich	53
5.1.3 Diskussion	56
5.2 <i>Chlorella vulgaris</i> und Chloroplasten	59
5.2.1 Fluoreszenzspektren	59
5.2.2 Abklingkurven im sub-ns-Zeitbereich	65
5.2.3 Diskussion	68
6 Photosystem I	73
6.1 Fluoreszenz im μs - und ns-Zeitbereich	73
6.1.1 Anregung mit ns-Pulsen	73
6.1.2 Anregung mit 200 ps-Laserpulsen	78
6.2 Fluoreszenz im sub-ns-Zeitbereich	81
6.2.1 Zeitaufgelöste Spektren und Abklingverhalten	83
6.2.2 Diskussion - Anregungstransfer im Photosystem I	92
7 Zusammenfassung	97
8 Literaturverzeichnis	101
A Anhang	111
A.1 Puffer und Medien	111
A.2 Abkürzungen	112

Kapitel 1

Einleitung

Die von der Sonne ausgestrahlte Energie stellt für den Planeten Erde den einzigen nennenswerten Energiezuwachs dar. Pro Jahr treffen etwa 0.4 bis $1 \cdot 10^{22}$ kJ auf die Erdoberfläche, davon ca. 50 % im sichtbaren Bereich des Spektrums (U. Siggel, 1991). Zum Vergleich sei hier auf den menschlichen Energieverbrauch hingewiesen, der $\sim 4 \cdot 10^{17}$ kJ/Jahr beträgt. Durch die Photosynthese werden zwischen 0.05 und 0.1 % der eingestrahnten Sonnenenergie in Form von chemischer Energie fixiert. Dieser Prozeß bildet dadurch die Grundlage für das Leben auf der Erde.

Die Bedeutung der Photosynthese führt zu zwei sich ergänzenden Zielrichtungen in der Photosyntheseforschung, die wie folgt charakterisiert werden können:

- Photosyntheseforschung bildet einen Zweig der Grundlagenforschung. Zielsetzung ist, einen für die Entwicklung des Lebens in der heutigen Form fundamentalen Prozeß verstehen zu lernen. Die Bedeutung dieser Forschung läßt sich unter anderem an der Vergabe von zwei Nobelpreisen innerhalb von 5 Jahren für Arbeiten aus diesem Bereich erkennen (1988 an J. Deisenhofer, R. Huber und H. Michel; 1992 an R.A. Marcus).
- Photosyntheseforschung hilft, die Lebensgrundlagen auf der Erde zu erhalten. Gerade dieser anwendungsbezogene Aspekt gewinnt in den letzten Jahren vor dem Hintergrund der Diskussionen um Ressourcenschonung und Energieknappheit zunehmend an Bedeutung. Ziel ist ein 'Lernen von der Natur' bei einem Prozeß, der, im Gegensatz zu der von Menschen bisher praktizierten Energiegewinnung, bei 'Raumtemperatur' und Normaldruck abläuft.

Gerade für den letzten Aspekt stellt die genaue Kenntnis der Primärprozesse Anregungstransfer und Ladungstrennung eine unabdingbare Voraussetzung dar. In Pflanzen und Bakterien laufen diese Teilschritte in komplexen Proteinen ab. Eingelagerte Farbstoffpigmente erfüllen dabei eine Antennenfunktion. Sie leiten die Energie eines Lichtquantens mit einer Effizienz von nahezu 100 % an ein spezielles Chlorophyllmolekül weiter, das im angeregten Zustand ein Elektron abspalzt. Auf einer ns-Zeitskala wird diese Ladungstrennung durch Weitergabe des Elektrons an benachbarte Akzeptormoleküle stabilisiert.

Aufgrund der hohen Zeitauflösung bieten vor allem optische Untersuchungsmethoden die Möglichkeit, die Primärprozesse zu analysieren. Die Fluoreszenzspektroskopie nützt dabei einen der Verlustprozesse zur Beobachtung aus. Sie stellt damit eine 'non-invasive'-Methode dar, d.h. die Methode bewirkt keine Veränderungen im Untersuchungsobjekt.

Die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Anregungstransfers in den Antennensystemen von Photosystem I und II von höheren Pflanzen und Algen bzw. Cyanobakterien.

Als erster Schritt wurde dazu ein Meßplatz für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie im sub-ns-Zeitbereich aufgebaut. Er zeichnet sich durch seine einfache Erweiterungsmöglichkeit in den ps-Zeitbereich aus. In Verbindung mit einem bereits bestehenden Aufbau (Zeitauflösung von 100 ns) konnten damit Prozesse bis in den ms-Zeitbereich untersucht werden.

Da die an *in vivo*-Systemen gewonnenen Ergebnisse keine Fluoreszenz aus dem Photosystem I erkennen ließen, mußte dieser Teil der Experimente an Photosystem I-Präparationen (*in vitro*-Systeme) durchgeführt werden. Die Präparation erfolgte am Institut für Botanik in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hauska.

Entsprechend der Zielsetzung gliedert sich die Arbeit wie folgt:

Das hier anschließende Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die grundlegenden biochemischen und biophysikalischen Abläufe bei den Primärprozessen. Ausgehend vom Konzept des linearen Elektronentransportes werden Struktur und Funktion der Photosysteme I und II vorgestellt. Ein eigener Abschnitt befaßt sich mit dem Aufbau der Antennen und den verschiedenen Modellen für den Anregungstransfer.

Das nächste Kapitel beschreibt die Präparation von Chloroplasten und Photosystem I, sowie die Herstellung der Proben.

In Kapitel 4 wird der Meßplatz für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie vorgestellt. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Erzeugung kurzer Pulse mit einem Argonionenlaser und die Darstellung der Meßwerterfassung mittels Zeit-Amplituden-Konversion gelegt.

Kapitel 5 gibt die Ergebnisse an intakten Systemen (Algen, Cyanobakterien und Chloroplasten) wieder. Die Interpretation ist nur unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Antennensysteme möglich. Daher werden die Experimente mit Cyanobakterien in Abschnitt 5.1 diskutiert, während die Messungen an Algen und Chloroplasten in Kap. 5.2 dargestellt sind.

In Kapitel 6 sind die Experimente an Photosystem I-Präparationen von Spinat und *Anabaena variabilis* beschrieben. Die Untersuchungen erstreckten sich vom ms- bis in den sub-ns-Zeitbereich. Durch den Einsatz von Oxidations- und Reduktionsmittel wurde der Redoxzustand des primären Donors und der terminalen Akzeptoren gezielt beeinflusst. Die hier ermittelten Eigenschaften des Anregungstransfers in der Kernantenne des Photosystems I werden vor dem Hintergrund bekannter Modellvorstellungen diskutiert.

Kapitel 7 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Kapitel 2

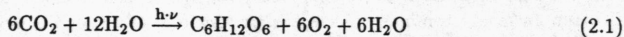
Photosynthese

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die grundlegenden biophysikalischen und biochemischen Abläufe der Primärprozesse der Photosynthese. Die in der Natur vorkommenden zwei Typen von Reaktionszentren, Photosystem I und Photosystem II, werden am Beispiel des Photosyntheseapparates von Pflanzen vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf der Darstellung von Photosystem I liegt. Anschließend soll auf neuere Ergebnisse eingegangen werden, die auf eine gemeinsame phylogenetische Abstammung der beiden Typen schließen lassen. Entsprechend ihrer Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit werden die Begriffe 'Antennen' und 'Anregungsweiterleitung' in einem eigenen Abschnitt behandelt.

2.1 Photosyntheseapparat bei Pflanzen – Überblick

Die Photosynthese als Prozeß, bei dem, ganz allgemein gesprochen, energiereiche Kohlenhydratverbindungen (v.a. Stärke und Zucker) unter Ausnutzung der Energie des Lichtes aufgebaut werden, läuft bei höheren Pflanzen und Grünalgen in eigenen Zellorganellen, den Chloroplasten, ab. Deren morphologische Kennzeichen sind eine eigene Hülle aus zwei parallel verlaufenden Biomembranen und ein charakteristisches Membransystem (Thylakoide) im Inneren. Je nach Ausgestaltung werden dabei gestapelte und ungestapelte Bereiche unterschieden.

In einer Bilanzgleichung läßt sich die Photosynthese folgendermaßen darstellen:



Eine Differenzierung der dabei ablaufenden Teilprozesse wird durch die Einteilung in Lichtreaktionen und Dunkelreaktionen erreicht.

Wie Abb. 2.1 veranschaulicht, wird in den Dunkelreaktionen CO_2 reduziert und zum Aufbau von Kohlenhydraten benutzt (Calvin-Zyklus). Dazu ist zum einen der Elektronencarrier NADPH nötig, zum anderen die energiereiche Verbindung ATP. Die Reaktionen laufen in der löslichen Phase (Stroma) der Chloroplasten ab. Das erste Enzym dieses Stoffwechselweges, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (kurz: Rubisco), ist zugleich das häufigste Protein in der Biosphäre (J.B. Marder und J. Barber, 1989).

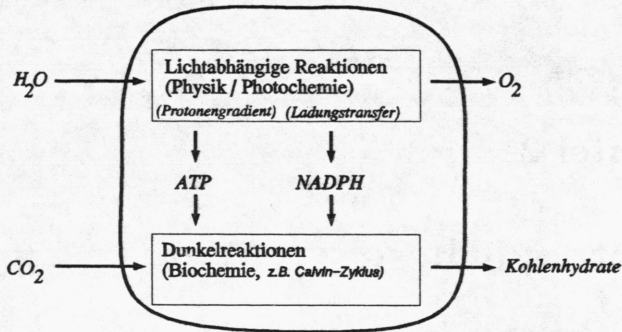


Abb. 2.1: Blockdiagramm der Photosynthese

Die Bildung von ATP und NADPH erfolgt durch die Lichtreaktionen. Die ersten Schritte dieses energieumwandelnden Prozesses werden durch das kooperative Zusammenwirken von drei verschiedenen Proteinkomplexen katalysiert, die in die Thylakoidmembran eingelagert sind (s. Abb. 2.2):

- Photosystem II (PS II)
- Cytochrom- b_6 -f-Komplex
- Photosystem I (PS I)

Den Ausgangspunkt der Lichtreaktionen bilden die Photosysteme, PS II und PS I. Anhand ihres Aufbaus sollen im folgenden einige grundsätzliche Begrifflichkeiten kurz erläutert werden. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in den Abschnitten 2.3 und 2.4.

Die beiden Photosysteme sind strukturell analog aufgebaut. Der innere Bestandteil, das Reaktionszentrum, wird durch zwei, relativ große Proteine (MW ca. 30 bzw. 80 kDa) gebildet, die sich zwar in gewissen Bereichen ähneln, aber nicht identisch sind (heterodimere Reaktionszentren). Eingelagert in diese Proteine sind der primäre Donor, der bei Anregung ein Elektron abspalten kann, sowie eine Kette von Akzeptormolekülen, die dieses abgespaltene Elektron an einen terminalen Akzeptor weiterleiten. Nach den entsprechenden Maxima in den Redox-Differenzspektren wird der primäre Donor beim PS II als P 680 ($\lambda_{max} = 680$ nm), bzw. beim PS I als P 700 ($\lambda_{max} = 700$ nm) bezeichnet. P 700 konnte als Chl a-Dimer identifiziert werden, während es sich bei P 680, entgegen früheren Zuordnungen, wahrscheinlich um ein Chl a-Monomer handelt (F.J.E. van Miegheem et al., 1991).

Zusätzlich befindet sich noch eine je nach Art unterschiedliche Anzahl von Chl-Molekülen in den beiden Proteinen. Sie bilden die Kernantenne. Ihre Aufgabe ist auch die Weiterleitung von Anregungsenergie von den äußeren Antennen zum primären Donor.

Die äußeren Antennen sind um das Reaktionszentrum herum angeordnet. In Abb. 2.2 ist dies beim PS II schematisch angedeutet. Es handelt sich dabei um Proteinkomplexe, in die Chlorophylle und andere Pigmente eingebunden sind. Die Bezeichnung Antenne, bzw. der

englische Ausdruck 'light harvesting complexes' (LHC), leitet sich von ihrer Funktion ab, dem Einfangen von Licht und dem Transfer der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum. Je nach Zugehörigkeit wird dabei zwischen äußeren Antennen am PS II (LHC II) und am PS I (LHC I) unterschieden.

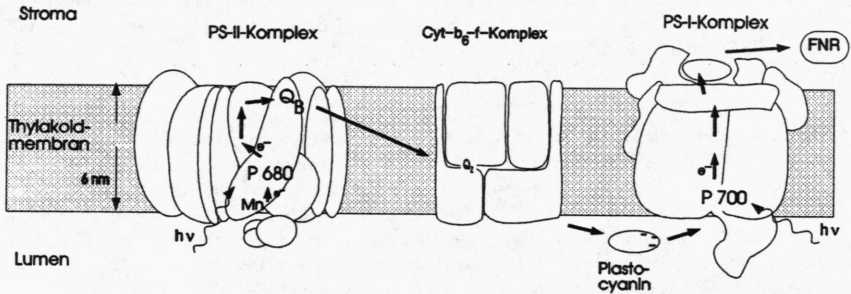
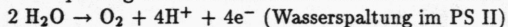


Abb. 2.2: Primärprozesse der Photosynthese - linearer Elektronentransport (Erklärung der Abkürzungen: siehe Text)

Anhand von Abb. 2.2 sollen nun die wichtigsten Schritte des linearen Elektronentransportes verdeutlicht werden.

Nach einer Anregung der Antennen am PS II durch Licht und anschließender Weiterleitung der Energie zum primären Donor wird ein Elektron am P 680 abgespalten und über die Akzeptorkette auf ein Chinon (Q_B) übertragen. Die Rückreduktion von P 680⁺ erfolgt über Elektronen, die bei der Spaltung von zwei Molekülen Wasser frei werden:

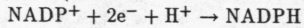


In Abb. 2.2 wird dieser Prozess durch 'Mn' symbolisiert, da an der Wasserspaltung ein Cluster von 4 Mn-Atomen beteiligt ist.

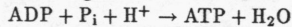
Q_B kann zwei Elektronen und, zur Erhaltung der Ladungsneutralität, aus dem Stroma zwei Protonen aufnehmen. Es wird damit zum Hydrochinon. Nach Ablösung vom PS II diffundiert es in der Membran zum Cytochrom- b_6f -Komplex. Dort werden die Elektronen an der Hydrochinon-Bindestelle an den Komplex abgegeben und die beiden Protonen in den inneren, von den Thylakoidmembranen umschlossenen Bereich (Lumen) freigesetzt (Beitrag zum Protonengradienten). Cytochrom-Komplexe treten sowohl in der Mitochondrien (Atmungskette), als auch in den Chloroplasten und Blaualgen auf (B.L. Trumpower, 1990; A. Riedel, 1991). Sie erfüllen in den verschiedenen Organismen die gleiche Funktion: die Übertragung zweier Elektronen von einem Hydrochinon auf ein wasserlösliches, lediglich membranassoziiertes Protein. Beim Cytochrom- b_6f -Komplex handelt es sich dabei um das Kupfer-Protein Plastocyanin, das als Elektronencarrier zum PS I fungiert. Es bindet dort an der Lumenseite der beiden Reaktionszentrumsproteine.

Die Einstrahlung eines weiteren Photons führt zur Ladungstrennung am primären Donor des PS I (P 700) und der Weiterleitung des Elektrons über die terminalen Akzeptoren auf Ferredoxin, einen Elektronencarrier. P 700⁺ wird von reduziertem Plastocyanin wieder reduziert.

Das Ferredoxin löst sich vom PS I und diffundiert zu einem Enzym, das die Übertragung von Elektronen auf NADP^+ katalysiert (Ferredoxin- NADP^+ -Oxidoreduktase, FNR):



Durch die bei der Wasserspaltung freierwerdenden Protonen und die Chinon-Hydrochinon- 'Protonenpumpe' baut sich über die Membran hinweg ein Protonengradient auf. Dieser wird von einem weiteren Enzym, der ATP-Synthase (CF_1/CF_0 Komplex), zum Aufbau von ATP durch die Phosphorylierung von ADP genützt:



Die zu beobachtende sehr große Effizienz der Ladungstrennungsprozesse, d.h. die geringe Rekombinationsrate, ist zurückzuführen auf den hohen Ordnungsgrad und die asymmetrische Organisation der Thylakoidmembran. Der Ladungstransfer über die Akzeptorkette hinweg verläuft in Richtung abnehmender Energie. Dadurch wird eine schnelle ($t \sim \text{ns}$) gerichtete Elektronenverschiebung von der Thylakoidinnen- zur Außenseite begünstigt. Der Gesamtwirkungsgrad der Photosynthese (Licht- und Dunkelreaktionen zusammengefaßt) liegt vor allem wegen dieses Energieverlustes bei maximal 30 % (L. Stryer, 1988).

In den folgenden Abschnitten werden Struktur und Funktion der für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit wichtigen Komponenten des Anregungs- und Ladungstransfers (Antennen, PS II und PS I) näher erläutert.

2.2 Antennen - Anregungsweiterleitung

Unter dem Begriff 'Antennen' werden Pigment-Protein-Komplexe verstanden, deren Aufgabe die Absorption von Licht und die Weiterleitung der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum ist.

2.2.1 Chlorophyll

Exemplarisch für die in der Natur vorkommenden Pigmente soll hier näher auf die Chlorophylle eingegangen werden. Abb. 2.3 zeigt die Strukturformeln von Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b).

Sie bestehen aus einem substituierten Tetrapyrrol-Ringsystem (Porphyrin) mit Mg als zentralem Ion und einem Phytolrest. Aufgrund der sp^2 -Hybridisierung der Atome in den Ringen I, II und III, sowie der dazwischenliegenden C-Atome, kommt es zur Ausbildung eines ausgedehnten π -Elektronensystems, an dem 18 Kohlenstoffatome beteiligt sind. Daraus ergibt sich eine planare Struktur des Porphyrinringes.

Das konjugierte π -Elektronensystem bestimmt die optischen Eigenschaften der Chlorophylle (G. Renger, 1992; J.N. Murrell, 1967).

Die 18 π -Elektronen des Ringsystems sind fest im Ring gebunden aber delokalisiert und können daher sehr gut mit der Theorie der freien Elektronen beschrieben werden.

Die Orbitale eines Elektrons werden analog zum quantenmechanischen Problem des Teilchens im Potentialkasten auf einen Kreisring des Umfangs d beschränkt. Eine Quantenzahl l , die der

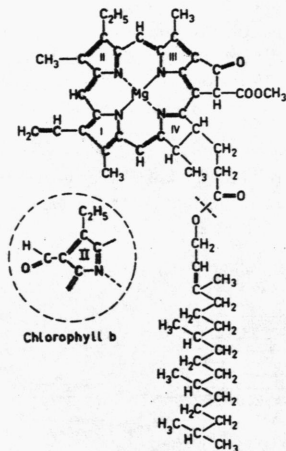


Abb. 2.3: Strukturformel von Chlorophyll
(H. Mohr, P. Schopfer, 1985)

Drehimpulsquantenzahl eines Elektrons in einem axialsymmetrischen Potentialfeld entspricht, charakterisiert die Orbitale. Für die Energieeigenwerte erhält man:

$$E_l = \frac{l^2 \hbar^2}{2md^2} \quad (2.2)$$

$$l = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$$

m: Masse des Elektrons

Nach der Pauli-Regel kann jeder Drehimpulszustand mit zwei Elektronen entgegengesetzten Spins besetzt werden. Die Elektronen verteilen sich also in folgender Weise auf die Energieniveaus (Abb. 2.4):

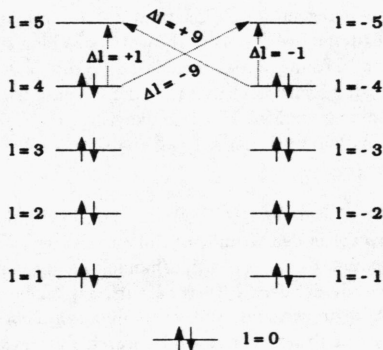


Abb. 2.4: Besetzung der Drehimpulsniveaus und mögliche niederenergetische Übergänge

Die 18 π -Elektronen des Chlorophyllmoleküls füllen die Niveaus bis $l = \pm 4$. Um die ersten angeregten Zustände ($l = \pm 5$) zu erreichen, sind Übergänge mit $\Delta l = \pm 9$ oder mit $\Delta l = \pm 1$ möglich. Nach den Hundschen Regeln führt der Übergang mit $\Delta l = \pm 9$ zu einem Zustand mit tieferer Energie (S_1), als der Übergang mit $\Delta l = \pm 1$ (S_2 -Zustand).

Die beiden Übergänge liegen im sichtbaren Spektralbereich. Abb. 2.5 zeigt das Absorptionsspektrum einer monomeren Chl a - Lösung, sowie das zugehörige Termschema.

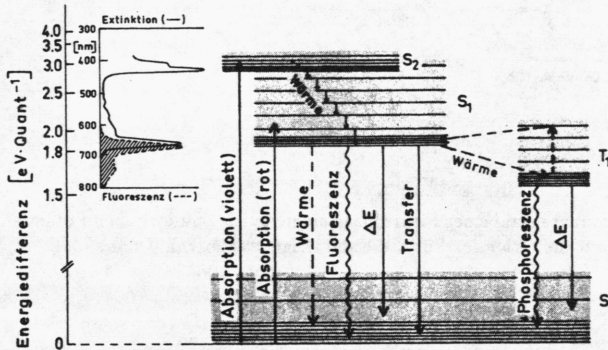


Abb. 2.5: Absorptionsspektrum und Termschema von Chlorophyll a (aus: H. Mohr, P. Schopfer, 1985)

Bei Chl a wird ein Übergang in den S_2 -Zustand durch Anregung mit $\lambda \approx 430$ nm, in den S_1 -Zustand mit $\lambda \approx 670$ nm erreicht. Die Absorptionsbanden sind sehr breit ausgeprägt und verschieben sich je nach Lösungsmittel um bis zu 50 nm (J.J. Katz et al., 1991). Bei der Anregung in den S_1 -Zustand wird noch zwischen der Q_x - und der Q_y -Anregung unterschieden, je nachdem parallel zu welcher Molekülachse die Anregung erfolgt. Bei Chl a liegt die Q_x -Anregung um ca. 80 nm blauverschoben gegenüber der Q_y -Anregung (G. Renger, 1992).

Im Termschema der Abb. 2.5 sind durch Pfeile die verschiedenen Möglichkeiten für Übergänge aus den angeregten Niveaus in den Grundzustand angedeutet. Der S_2 -Zustand relaxiert strahlungslos in den S_1 -Zustand, da die Vibrationsbanden der beiden Zustände überlappen. Wie von Duysens gezeigt wurde, ist der S_1 -Zustand auch der 'biologisch aktive' Zustand (L.N.M. Duysens, 1952). Die Anregungsenergie kann von ihm aus auf ein Nachbarmolekül übertragen, für einen photochemischen Prozeß genutzt oder durch Fluoreszenz abgegeben werden. Eine vierte Möglichkeit ist der strahlungslose Übergang in den Triplett-Zustand (T_1) durch intersystem-crossing (ISC). Der Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ ist spinverboten und daher sehr langlebig (Halbwertszeit ca. 10ms, H. Mohr, P. Schopfer, 1985). *In vivo* wird der Triplettzustand durch Carotinoide gelöscht (strahlungslose Relaxation). Dadurch wird die Reaktion zu Singulett-Sauerstoff und die Bildung von Sauerstoffradikalen verhindert (H. Kingma et al., 1985).

2.2.2 Antennenorganisation

Durch blitzlichtmanometrische Messungen der O_2 -Bildung an Algen konnten 1932 Emerson und Arnold (R. Emerson und W. Arnold, 1932) nachweisen, daß nicht alle Chl-Moleküle an photochemischen Reaktionen beteiligt sind. Dies führte zum Begriff der 'photosynthetischen Einheit', die aus einer großen Anzahl von Absorbermolekülen (Antennen) und einem photochemisch reaktiven Zentrum (Reaktionszentrum) bestehen. Die Anzahl der Absorbermoleküle liegt in der Größenordnung von einigen hundert Molekülen pro photosynthetischer Einheit. Je nach Spezies handelt es sich dabei nicht nur um Chl-Moleküle. Tab. 2.1 gibt einen Überblick über die bei Pflanzen und Grünalgen, sowie Cyanobakterien hauptsächlich vorkommenden Pigmente.

	Pigment	Absorption	Vorkommen
Pflanzen und Grünalgen	Chlorophyll a	670–700 nm	} im Kernkomplex und Lichtsammelkomplex
	Chlorophyll b	um 650 nm	
Cyanobakterien	Chlorophyll a	670–700 nm	} in den Phycobilisomen
	Phycocyanin	ca. 540–570 nm	
	Phycocyanin	um 620 nm	
	Allophycocyanin	um 650 nm	

Tabelle 2.1: Antennenpigmente bei Pflanzen, Grünalge und Cyanobakterien (nach G. Richter, 1981)

Aus der Aufstellung in Tab. 2.1 wird deutlich, daß die Pigmente nicht nur eine räumliche, sondern auch eine spektrale 'Antennenfunktion' besitzen. Vor allem die Chlorophylle können in ihren Absorptionsmaxima sehr stark variieren, entsprechend der direkten Umgebung, in der das Molekül sich befindet (siehe Kap. 2.2.1).

In vivo sind die Antennenpigmente in Proteine eingelagert (Pigment-Protein-Komplexe). Ihre Größe schwankt zwischen ca. 25 kDa und 80 kDa (J.H. Golbeck et al., 1991; J. Garnier et al., 1986). In der Regel ragen sie durch die Thylakoidmembran hindurch und sind um die, das Reaktionszentrum tragenden Proteine herum angeordnet. Nur die Phycobilisomen bei den Cyanobakterien bilden scheibchenförmige Stapel, die auf der Membran sitzen.

Die Verteilung spektral unterschiedlicher Antennenpigmente auf die Proteinkomplexe ist noch nicht vollständig geklärt. Aus Fluoreszenzmessungen an verschiedenen Photosystempräparationen (T.G. Owens et al., 1987; J. Wachtveitl, 1986; R. Sparrow et al., 1990) und an Mutantstämmen von Bakterien (T.G. Owens et al., 1989) läßt sich jedoch eine grobe Einteilung in periphere Lichtsammelsysteme ('light harvesting complexes', LHC) und eine zentrale Antenne (Kernantenne) vornehmen. Letztere sitzt in unmittelbarer Nähe zum primären Donor, P 680 bzw. P 700, der photosynthetischen Einheit. Für PS I konnten T.G. Owens et al. die Größe der Kernantenne aus der Abnahme der Fluoreszenzabklingzeit in Abhängigkeit vom Chlorophyllgehalt der Probe mit ca. 60 – 70 Chl a - Moleküle pro P 700 bestimmen (T.G. Owens et al., 1987).

Die Unterscheidung zwischen LHC und zentraler Antenne läßt jedoch a priori noch keine Aussage über die Verteilung der spektral unterschiedlichen Pigmente in den Antennen zu, da hierbei nur das Vorhandensein mehrerer Pigment-Protein-Komplexe festgestellt wird. In der Diskussion stehen zwei Modelle (R. Kopelman, 1976):

- *funnel model*: Die Pigmente sind spektral ansteigend zum Reaktionszentrum hin angeordnet. Es ergibt sich ein gerichteter Transfer der Anregungsenergie hin auf das Reaktionszentrum.
- *random lattice model*: Spektral unterschiedliche Antennenpigmente sind, räumlich gesehen, statistisch in den Proteinen verteilt.

Entsprechend dem geschwindigkeitsbestimmendem Schritt beim Anregungstransfer und -einfang werden im 'random lattice'-Modell zwei Grenzfälle unterschieden (N.E. Geacintov und J. Breton, 1987):

- Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die 'Diffusion' der Anregung in der Antenne (*diffusion-limited case*, A.R. Holzwarth, 1990). Erreicht die Anregung das Reaktionszentrum das erste Mal, wird sie dort eingefangen und die Ladungstrennung findet statt.
- Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist das 'Trappen' der Anregung im Reaktionszentrum (*trap-limited case*, T.G. Owens et al., 1988 und 1989). Das Einfangen der Anregung am Reaktionszentrum ist vergleichsweise langsam, sodaß sie es mit einer nicht verschwindenden Wahrscheinlichkeit wieder verlassen kann.

2.2.3 Theorie der Anregungsübertragung

Nach der Einführung des Begriffes der 'Photosynthetischen Einheit' war der molekulare Mechanismus der Energieübertragung zwischen den Pigmenten in den Antennen und zwischen Antennen und Reaktionszentrum lange Zeit eine der ungeklärten Fragen der Photosyntheseforschung. Viele Möglichkeiten des Energietransfers, darunter auch die chemische Diffusion oder Anregungstransfer über den Triplettzustand, wurden in Betracht gezogen. 1952 zeigte schließlich Duysens, daß die Photoenergie in der Regel über den ersten angeregten Singulettzustand weitergegeben wird (L.N.M. Duysens, 1952).

Ungefähr zur selben Zeit veröffentlichten Förster und Dexter ihre Arbeiten über 'sensitized luminescence', d.h. den strahlungslosen Übergang von Anregungsenergie von einem Molekül D (Absorber) auf ein Molekül A (Emitter), das anschließend diese Energie in Form von Fluoreszenz abgibt (T. Förster, 1947 und 1948; D.L. Dexter, 1953).

Obwohl Förster und Dexter ihre Ergebnisse bei der Bearbeitung von Fragestellungen aus der Molekül- bzw. Festkörperphysik erhielten, läßt sich vor allem die von Förster entwickelte Theorie des Resonanztransfers sehr gut auf das Problem der Anregungsweiterleitung in Antennensystemen übertragen. Im folgenden werden die Grundzüge dieser Theorie dargestellt.

Förster - Dexter - Mechanismus

Ein angeregtes Donormolekül D und ein Akzeptormolekül A im Grundzustand sind über Coulombwechselwirkung gekoppelt. Nimmt man an, daß nur zwei Elektronen, eines von D und eines von A beteiligt sind, kann man den Ausgangszustand mit der vollständig antisymmetrisierten Wellenfunktion Φ_I beschreiben:

$$\Phi_I = \frac{1}{\sqrt{2}}(\varphi_D^1(1)\varphi_A^0(2) - \varphi_D^1(2)\varphi_A^0(1)) \quad (2.3)$$

Dabei sind φ_D^1 und φ_A^0 die lokalen Wellenfunktionen des angeregten Singulettzustandes von D und des Grundzustandes von A. Die Indizes (1) und (2) beziehen sich auf die beteiligten Elektronen.

Entsprechend gilt für den Endzustand Φ_F :

$$\Phi_F = \frac{1}{\sqrt{2}}(\varphi_D^0(1)\varphi_A^1(2) - \varphi_D^0(2)\varphi_A^1(1)) \quad (2.4)$$

Die Wechselwirkungsenergie U_{DA} zwischen den Molekülen kann man durch die Bildung des Matricelements der beiden Wellenfunktionen berechnen:

$$U_{DA} = \langle \Phi_F | \hat{H}_{DA} | \Phi_I \rangle = U_{DA}^C + U_{DA}^{Ex} \quad (2.5)$$

\hat{H}_{DA} : Wechselwirkungsoperator

Die Wechselwirkung läßt sich in zwei Beiträge aufspalten:

$$\text{den (direkten) Coulombterm} \quad U_{DA}^C = \frac{1}{2} \cdot \langle \varphi_D^0(1)\varphi_A^1(2) | \hat{H}_{DA} | \varphi_D^1(1)\varphi_A^0(2) \rangle \quad (2.6)$$

$$\text{den Austauschterm} \quad U_{DA}^{Ex} = \frac{1}{2} \cdot \langle \varphi_D^0(2)\varphi_A^1(1) | \hat{H}_{DA} | \varphi_D^1(1)\varphi_A^0(2) \rangle \quad (2.7)$$

Die Gleichungen 2.6 und 2.7 kennzeichnen die beiden Grenzfälle.

Die Austauschwechselwirkung trägt vornehmlich bei kleinen Molekülabständen zum Energietransfer bei. Es kommt dabei zu einem Überlappen der Wellenfunktionen. In diesem Fall kann das angeregte Elektron nicht mehr eindeutig einem der beiden Moleküle zugeordnet werden. Die Übergangswahrscheinlichkeit für die Anregung ist proportional dem Überlappintegral der Wellenfunktionen, mit dem Proportionalitätsfaktor $Z^2 = K^2 \exp(-2R/L)$. K ist eine Konstante der Dimension Energie, R der Molekülabstand und L kennzeichnet den effektiven mittleren Bohrradius (B. Di Bartolo, 1984). Durch die Austauschwechselwirkung können damit auch verbotene Anregungsweiterleitungen erfaßt werden, z.B. der Energieübertrag von einem ^TChl auf ein Carotinoid.

Der langreichweitige Coulombterm dagegen beschreibt den Anregungstransfer bei großen Molekülabständen. Unter der Voraussetzung schwacher Wechselwirkung zwischen den Molekülen, d.h. U_{DA} ist kleiner als die Breite der Vibrationsbanden der einzelnen Moleküle, läßt sich der Wechselwirkungsoperator mit Störungsrechnung 1. Ordnung darstellen. Diese Wechselwirkung kann als Summe der Coulombwechselwirkungen der Elektronen und der Kerne A und B ausgedrückt werden. Für Dipol-Dipol-Wechselwirkung ergibt sich aus der Reihenentwicklung eine R^{-3} -Abhängigkeit. Die charakteristische Zeit τ_{DA} der Anregungsweiterleitung zwischen den Molekülen läßt sich in diesem Fall wie folgt schreiben (T. Förster, 1948):

$$\tau_{DA} = \tau_f^D \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6 \quad (2.8)$$

mit dem Försterradius R_0 gegeben durch:

$$R_0^6 = 8,785 \cdot 10^{17} \kappa^2 n^{-4} \int F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad (2.9)$$

- τ_f^D : natürliche Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donormoleküls
 $\epsilon_A(\nu)$: molarer Extinktionskoeffizient
 $F_D(\nu)$: normalisiertes Emissionsspektrum
 n : Brechungsindex des Mediums
 κ : räumlicher Orientierungsfaktor
 R_{DA} : Abstand zwischen Donor und Akzeptor

Der Orientierungsfaktor κ beschreibt die Abhängigkeit von der räumlichen Anordnung der beiden Dipole zueinander (Abb. 2.6).

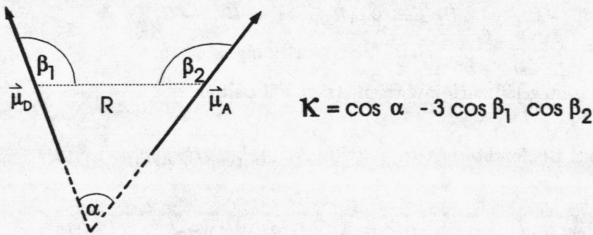


Abb. 2.6: Der Orientierungsfaktor κ ($\vec{\mu}_A, \vec{\mu}_D$: Dipolmomente)

Die möglichen Werte von κ variieren von 0 bis 4. Die tatsächliche Lage der Dipole wird durch die Proteine bestimmt, mit denen die Moleküle verbunden sind. Förster hat den Mittelwert für eine zufällige räumliche Verteilung berechnet:

$$\overline{\kappa(\alpha, \beta_1, \beta_2)} = 2/3$$

Der Försterradius R_0 beschreibt die kritische Entfernung der Anregungsübertragung (d.h. die Entfernung, bei der die Anregung mit 50 % Wahrscheinlichkeit von D auf A übergeht).

Betrachtet man z.B. zwei gleiche Bakterienchlorophyllmoleküle mit der natürlichen Lebensdauer $\tau_f^D = 18 \cdot 10^{-9} \text{ s}$ und $R_0 = 8 \text{ nm}$, so kann man aus der Förstergleichung (2.8) die Zeit τ_{DA} wie folgt berechnen (A.Y. Borisov, 1989):

Bei einem Abstand von 4 nm zwischen den Zentren der Bakterienchlorophyllmoleküle findet man

$$\tau_{DA} = 18 \cdot 10^{-9} \text{ s} \cdot \left(\frac{4 \text{ nm}}{8 \text{ nm}} \right)^6 = 280 \text{ ps}$$

und bei 2 nm Abstand verkürzt sich die Zeit auf

$$\tau_{DA} = 18 \cdot 10^{-9} \text{ s} \cdot \left(\frac{2 \text{ nm}}{8 \text{ nm}} \right)^6 = 4,4 \text{ ps}$$

Die Temperaturabhängigkeit der Anregungsweiterleitung wird durch Gl. 2.8 nicht explizit ausgedrückt, sondern ist über R_0 gegeben. In die Berechnung des Förster-Radius geht der energetische Überlapp aus dem Emissionsspektrum von A und dem Absorptionsspektrum von B ein (siehe Gl. 2.9). Bei höheren Temperaturen, d.h. Besetzung höherer Schwingungs- und Rotationsniveaus, ist dieser energetische Überlapp wegen der Verbreiterung der Spektren größer, und damit die Anregungsweiterleitung erleichtert (Resonanz).

Reale Antennen

Die bisherige Betrachtung beschränkte sich auf den Anregungstransfer zwischen zwei gleichen Molekülen im Abstand R_{DA} . In realen Antennensystemen liegen jedoch eine große Anzahl z.T. unterschiedlicher Absorbermoleküle (siehe Abschnitt 2.2.2), als auch ein Reaktionszentrum als Trap vor. Da genaue Daten über Struktur und Aufbau der Antennensysteme nicht vorliegen, ist man bei der Beschreibung dieser Situation auf Modellüberlegungen angewiesen. Die zwei wichtigsten Modelle werden hier vorgestellt.

I. Random-Walk-Modell (R.M. Pearlstein, 1982)

Ausgangsbild: Antennenmoleküle und Reaktionszentren (RC) besetzen die Plätze eines regulären Gitters. Die Konzentration der Antennenmoleküle ist größer als die Konzentration der Reaktionszentren. Wegen ihres häufigen Gebrauchs in der Literatur sei noch auf folgende Unterscheidung hingewiesen (G.W. Robinson, 1967):

a) 'puddle'-Modell: Anzahl der RC = 1

b) 'lake'-Modell: Anzahl der RC > 1

Beide Modelle sind jedoch in der Beschreibung äquivalent, wenn für das 'lake'-Modell angenommen wird, daß einem Reaktionszentrum N-1 Antennenmoleküle zugeordnet sind, das Gitter unendlich ausgedehnt ist, und die Reaktionszentren periodisch verteilt auftreten (d.h. ein Übergitter bilden).

Nach einem kurzen Lichtpuls führt die Anregung in der Antenne eine 'random-walk'-Bewegung aus, in dem sie von einem Molekül zum nächsten hüpft, bis sie ein Reaktionszentrum erreicht. Dort kann sie entweder 'getrappt' und für einen photochemischen Prozeß genutzt werden, oder sie kehrt in die Antenne zurück. Der Anregungstransfer innerhalb der Antenne und zwischen Antenne und Reaktionszentrum wird durch einen Förster-Dexter-Mechanismus beschrieben.

Für die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeit, das Molekül 'i' zur Zeit t im angeregten Zustand vorzufinden, gilt:

$$\frac{d\rho_i(t)}{dt} = \sum_j F_{ij}(\rho_j - \rho_i) - K_A \rho_i \quad (2.10)$$

F_{ij} sind die Förster-Raten für den Anregungstransfer zwischen den Molekülen 'i' und 'j', K_A ist die Summe aller Ratenkonstanten für die verschiedenen Abklingmöglichkeiten der Anregung (Fluoreszenz, ISC, etc.). Die Antennenmoleküle werden hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften als absolut gleichartig angesehen.

Mit $\bar{\rho}(t) = \sum_i \rho_i(t)$ lassen sich, für nicht zu große Anregungsintensitäten, die Lösungen dieses Gleichungssystems darstellen als:

$$\bar{\rho}(t) \sim e^{-\frac{t}{\tau_{rw}}} \quad (2.11)$$

Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität erfolgt proportional zu $\bar{\rho}(t)$ und damit monoexponentiell. Die 'random-walk'-Lebensdauer τ_{rw} einer Anregung ist gegeben durch:

$$\tau_{rw} = \left(\frac{1}{q'F_T} - \frac{1}{q'F_A} \right) \frac{(N-1)^2}{N} + \frac{\alpha N}{F_A} + \frac{F_D}{F_T} \frac{(N-1)}{k_p} + \frac{1}{k_p} \quad (2.12)$$

Dabei sind:

- F_A : Rate für den Anregungstransfer zwischen benachbarten Antennenmolekülen (Förster-Rate, s. Gl. 2.8)
 F_T, F_D : Raten für Transfer zum RC (trapping) und vom RC weg (detrapping)
 k_p : Rate für den photochemischen Prozeß
 q' : Koordinationszahl (für ein zwei-dimensionales quadratisches Gitter: $q' = 4$)
 α : Konstante, die von Gitterparametern abhängt (z.B. Dimensionalität, etc.)

Für den Spezialfall $F_A = F_T = F_D$ vereinfacht sich Gl. 2.12 zu:

$$\tau_{rw} = \alpha N F_A^{-1} + N k_p^{-1} \quad (2.13)$$

Der erste Term wird als 'first passage'-Zeit τ_{fpt} bezeichnet. Damit ist die Zeit gemeint, die eine Anregung braucht, um das Reaktionszentrum das erste Mal zu erreichen.

Der Term mit k_p^{-1} ist die Zeit, die für den photochemischen Prozeß am Reaktionszentrum (Ladungstrennung) benötigt wird. Der Multiplikator N ergibt sich, da für ein endliches k_p die Anregung eine nicht verschwindende Wahrscheinlichkeit hat, das Reaktionszentrum wieder zu verlassen. In diesem Fall führt sie eine 'random walk'-Bewegung aus, deren Länge im allgemeinen Fall N Schritte beträgt, unabhängig von der Gittergeometrie.

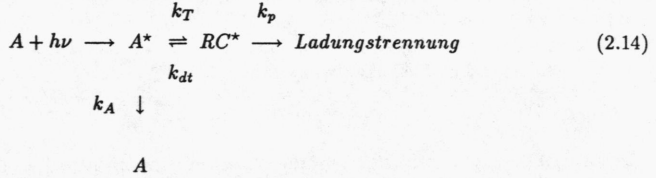
Analog läßt sich Gl. 2.12 als additiver Prozeß auffassen, wobei die beiden ersten Terme τ_{fpt} , und die letzten beiden Terme die Lebensdauer für die Ladungstrennung ergeben.

Mit Hilfe der beiden Gleichungen (2.12 und 2.13) ist es möglich, die in Abschnitt 2.2.2 eingeführten Begriffe 'Diffusions-limitiert' und 'Trap-limitiert' quantitativ zu erfassen:

- Diffusions-limitierter Anregungstransfer: $\tau_{fpt} \gg N k_p^{-1}$
 Die Ladungstrennung ist sehr viel schneller als die Transferzeit zum Reaktionszentrum, d.h. die Anregung kann das Reaktionszentrum nach dem ersten Eintreffen nicht wieder verlassen.
- Trap-limitierter Anregungstransfer: $N k_p^{-1} \gg \tau_{fpt}$
 Der Anregungstransfer ist schnell im Vergleich zur Ladungstrennung. Eine Anregung kann das Reaktionszentrum wieder verlassen und, wie oben beschrieben, eine 'random walk'-Bewegung in der Antenne ausführen.

II. Kinetisches Modell - Zwei-Komponenten-Modell (W.L. Butler, 1978)

Ausgangsbild: Die Lichtsammelsysteme (LHC) sind eng an die Kernantenne gekoppelt und bilden mit ihr eine Einheit (A). Der Energietransfer von den angeregten Antennenmolekülen (A^*) zum Reaktionszentrum (RC) läuft mit einer Ratenkonstante k_T ab. Die Energie kann entweder zur Ladungstrennung genutzt werden (Ratenkonstante k_p), oder sie kehrt in die Antenne zurück (Ratenkonstante k_{dt}).



Die Ratenkonstante k_A steht hier für alle Deaktivierungsmöglichkeiten, die in den Antennen auftreten können (z.B. Fluoreszenz, ISC).

Im Gegensatz zum Modell I wird hier der *in vivo*-Situation insoweit Rechnung getragen, als zwischen LHC und Kernantenne unterschieden wird. Die Einführung einer starken Kopplung der beiden kann als Grenzfallbeschreibung angesehen werden, mit der sich die weitere theoretische Behandlung vereinfacht. Auf die mögliche Erweiterung dieses Modells zum Drei-Komponenten-Modell, d.h. Lichtsammelsysteme und Kernantenne werden als getrennten Einheiten betrachtet, soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie am Grundprinzip nichts ändert.

Bei den kinetischen Modellen werden Einzelheiten der mikroskopischen Abläufe, wie etwa die 'random-walk'-Bewegung der Anregung in der Antenne, nicht berücksichtigt. Anregungstransfer und -einfang werden durch die makroskopischen Ratenkonstanten k_A , k_T , k_{dt} und k_p beschrieben.

Nach einem Anregungspuls läßt sich die zeitliche Entwicklung der Anregungszustände im Zwei-Komponenten-Modell (Gl. 2.14) durch einen Satz gekoppelter Differentialgleichungen ausdrücken:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -(k_T + k_A)[A^*] + k_{dt}[RC^*] \quad (2.15)$$

$$\frac{d[RC^*]}{dt} = k_T[A^*] - (k_{dt} + k_p)[RC^*] \quad (2.16)$$

Die Lösungen lauten:

$$[A^*] = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (2.17)$$

$$[RC^*] = C_3 e^{-\lambda_1 t} + C_4 e^{-\lambda_2 t} \quad (2.18)$$

Dabei sind λ_1 und λ_2 die Eigenwerte zur Koeffizientenmatrix der Gleichungen 2.15 und 2.16:

$$\lambda_1 = 1/2(k_A + k_p + k_T + k_{dt}) + \sqrt{(k_A + k_T - k_p - k_{dt})^2 + 4k_T k_{dt}} \quad (2.19)$$

$$\lambda_2 = 1/2(k_A + k_p + k_T + k_{dt}) - \sqrt{(k_A + k_T - k_p - k_{dt})^2 + 4k_T k_{dt}} \quad (2.20)$$

Die Amplituden C_i ergeben sich aus den Randbedingungen des Problems.

Aus dem Lösungsansatz für die Differentialgleichungen wird ersichtlich, daß für positive C_1 und C_2 das Fluoreszenzabklingen nach einer Anregung durch eine Summe von mindestens zwei Exponentialfunktionen beschrieben wird (im Drei-Komponenten-Modell: drei e-Funktionen). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu 'random-walk'-Modell, das nur ein einfach exponentielles Abklingen vorhersagt.

Die unter I und II vorgestellten Modelle stellen nur Arbeitshypothesen dar. Dies wird schon daran deutlich, daß sie in vielen Bereichen unzulässig vereinfachen: spektrale Heterogenitäten in der Antenne, Abschirmeffekte der Proteinumgebung beim Anregungstransfer oder Clusterbildung von Antennenmolekülen, um nur einige Beispiele zu nennen, werden in beiden Modellen vernachlässigt. Entsprechend vielfältig und widersprüchlich sind die Veröffentlichungen zu diesem Thema, da die Anpassungsparameter in den Grundgleichungen der Modelle von den Versuchsbedingungen abhängen (siehe dazu Reviews von R. van Grondelle, 1985 und A.Y. Borisov, 1989). Diese sind jedoch nur bei *in vitro*-Versuchen zu standardisieren, sodaß Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation immer mit Fehlern behaftet sind.

Verschiedene neuere Veröffentlichungen deuten jedoch darauf hin, daß für das Photosystem II die im 'random-walk'-Modell eingeführten Begrifflichkeiten eine richtige Beschreibung der Anregungstransfervorgänge liefern. So finden Schatz et al. (1988) aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen, daß in isolierten PS II-Präparationen der Anregungstransfer 'trap'-limitiert abläuft. Ebenfalls aus zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimenten, jedoch an intakten Chloroplasten, schließen Valkunas et al. (1992) auf eine Verknüpfung der PS II-Einheiten im Sinne des 'lake'-Modells, wie sie bereits schon von Geacintov und Breton (N.E. Geacintov, J. Breton, 1987) postuliert wurde.

2.3 Photosystem II

Das Photosystem II (PS II) läßt sich von seiner Funktion her als lichtgetriebene Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase bezeichnen. Die Elektronen für diese Reaktion werden bei der Wasserspaltung freigesetzt, die im Reaktionszentrum stattfindet. Das PS II kommt in den Chloroplasten hauptsächlich in den gestapelten Bereichen des Thylakoidsystems vor (B. Andersson, J.M. Anderson, 1980). Es ist ein membrandurchragender Pigment-Proteinkomplex, der aus zwei Komponenten besteht:

- Lichtsammelsystem II (LHC II)
- Kernkomplex (mit Wasserspaltung, primärer Donor, Akzeptorkette)

Die einzelnen Komponenten werden im folgenden kurz charakterisiert. Die Wasserspaltung wird dabei, obwohl sie nach neueren Erkenntnissen ein integraler Bestandteil vom PS II ist (siehe auch Review von A.W. Rutherford et al., 1992), aus Gründen der Übersichtlichkeit in einem eigenen Abschnitt behandelt.

Das Lichtsammelsystem II (LHC II)

Das Lichtsammelsystem ist um den Kernkomplex herum angelagert und besteht pro PS II aus vier Proteinen (MW 21 bis 31 kDa) (P.R. Chitnis, J.P. Thornber, 1988). In die Proteine sind einige hundert Pigmentmoleküle eingebettet, vor allem Chlorophylle, aber auch Carotinoide. Der LHC II Komplex transportiert Anregungsenergie zum Kernbereich des PS II (Kernantenne und Reaktionszentrum) (siehe Kap. 2.2).

Der Kernkomplex

Der Kernkomplex besteht aus mindestens sechs Untereinheiten, die chloroplastencodiert sind (J.B. Marder, J. Barber, 1989). Die beiden wichtigsten, die Proteine D₁ und D₂ (MW 32 bzw. 30 kDa), binden den wasserspaltenden Mn-Cluster, den primären Donor und die Akzeptorkette. Über ihre Struktur und ihren Aufbau können heute fundierte Voraussagen gemacht werden. Dies liegt an der großen Übereinstimmung mit dem Reaktionszentrum (RZ) der Purpurbakterien. H. Michel, J. Deisenhofer und R. Huber war die Röntgenstrukturaufklärung des Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* mit 3 Å Auflösung gelungen (J. Deisenhofer et al., 1984, 1985). Es war die erste Strukturaufklärung eines membrandurchragenden Proteins. Die Analogie zwischen PS II und dem Reaktionszentrum der Purpurbakterien gründet sich unter anderem auf folgende Argumente:

- a) Die Gensequenzen zeigen, daß D₁ und D₂ in bestimmten Bereichen homolog zu den bakteriellen Proteinen L und M aufgebaut sind (J.C. Williams et al., 1983, 1984; D.C. Youvan et al. 1984a,b).
- b) Der isolierte Reaktionszentrenkomplex weist eine ähnliche Pigmentzusammensetzung wie das PS II auf (J. Barber et al., 1987, J.P. Thornber et al., 1983).

Wegen der Analogie zwischen den beiden Photosynthesezentren (PS II und RZ) soll im folgenden kurz der Ladungstransfer im Reaktionszentrum der Purpurbakterien vorgestellt werden. Die in Abb. 2.7 beschriebene Abfolge der Akzeptoren gilt hier analog, wenn man die Bezeichnungen der Chlorophylle (Chl) und Phaeophytine (Phaeo) durch Bakteriochlorophyll (BChl) und Bakteriophaeophytin (BPhaeo) ersetzt.

Den primären Donor bildet ein Bakteriochlorophyll-Dimer (BChl-Dimer, 'special pair'). Nach einer Anregung in den S₁-Zustand wird ein Elektron abgespalten, das innerhalb von 3-4 ps zu einem Bakteriophaeophytinmolekül (BPhaeo) gelangt. Die Frage der direkten Beteiligung des zum primären Donor benachbarten akzessorischen BChl-Moleküls (BChl_{ak}) ist derzeit nicht endgültig geklärt (M.Bixon et al., 1987; W. Zinth et al., 1985). Neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe von W. Zinth (W. Holzapfel et al., 1989), die Absorptionsmessungen mit fs-Zeitauflösung an Reaktionszentren von *R. sphaeroides* durchführten, deuten jedoch darauf hin, daß dieses akzessorische BChl-Molekül direkt in den Elektronentransfer involviert ist. Vom BPhaeo⁻ wird das Elektron über ein Chinon (Q_A) auf den terminalen Akzeptor, ein weiteres Chinon (Q_B), weitergeleitet. Das zwischen den beiden Chinonen liegende Eisenion (Fe²⁺) scheint eine die Ladungstrennung stabilisierende Funktion zu besitzen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse hierzu findet sich bei G. Renger (1992).

Auffällig am Reaktionszentrum der Purpurbakterien ist die spiegelsymmetrische Anordnung der Pigmente und Chinone. Die Symmetrieachse wird dabei durch das Eisenion und den primären Donor festgelegt. Trotzdem läuft der Elektronentransfer mit einer um den Faktor 200 höheren Effizienz über einen Zweig, den auf dem L-Protein befindlichen (L-Zweig, in

Abb. 2.7 links) (E.C. Kellog et al., 1989). Gründe für diese Asymmetrie sind zum einen Abweichungen von der exakten C_2 -Symmetrie, und zum anderen Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung, die zu einer Energieabsenkung für den Elektronentransfer über den L-Zweig führen (M.E. Michel-Beyerle et al., 1988).

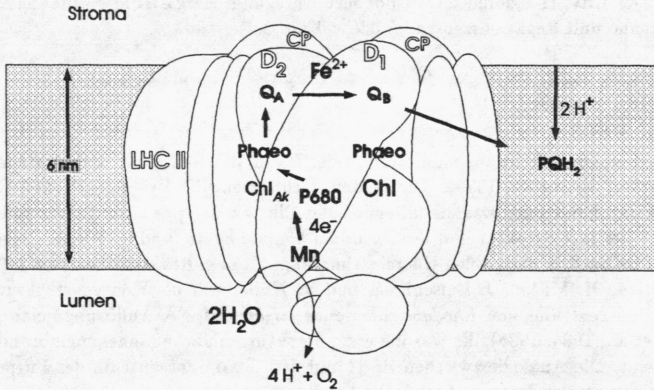


Abb. 2.7: PS II-Komplex (nach A.W. Rutherford et al., 1989); CP: innere Antennenkomplexe; sonstige Abkürzungen: siehe Text

Auf der Grundlage der angenommenen Analogie zwischen PS II und dem Reaktionszentrum der Purpurbakterien, sowie unter Einbeziehung der bisherigen Erkenntnisse über das PS II ergibt sich das in Abb. 2.7 gezeigte Modell des Aufbaus von Photosystem II.

Die D-Proteine weisen als Charakteristika 5 Helices auf, die die Membran durchragen. Jeweils zwei davon überkreuzen sich auf der stromalen Seite. Die funktionalen Gruppen liegen zwischen, bzw. auf diesen sich überkreuzenden Abschnitten.

Im Gegensatz zum Reaktionszentrum der Purpurbakterien scheint der primäre Donor im PS II ein Chl a-Monomer zu sein. Nach seinem Absorptionsmaximum in Redoxdifferenzspektren bei 680 nm wird er P 680 genannt.

Die Frage nach der Natur des primären Donors im PS II (Monomer oder Dimer) ist von besonderer Bedeutung, da im Falle eines Monomers die bisher als gültig angenommene Analogie zum Reaktionszentrum der Purpurbakterien an einer wichtigen Stelle durchbrochen wird, nämlich bei der primären Ladungstrennung. ESR-Untersuchungen des Triplettzustandes im PS II weisen auf ein Chl a-Monomer hin, das um 30° gegen die Membranachse geneigt ist (F.J.E. van Mieghem et al., 1991). Dieser Triplettzustand wird dem primären Donor zugeschrieben. Im Gegensatz dazu findet sich im Reaktionszentrum der Purpurbakterien ein BChl-Dimer, das senkrecht zur Membranachse ausgerichtet ist (J. Deisenhofer et al., 1984, 1985). Um trotzdem das Analogieprinzip aufrecht zu erhalten werden für das PS II sowohl eine schwache Kopplung mit einem zweiten Chl a-Molekül, als auch die Zuordnung des primären Donors zu einem der akzessorischen Chl a-Moleküle (Chl_{Ak}) diskutiert (F.J.E. van Mieghem et al., 1991).

Der Elektronentransfer verläuft im PS II analog zum Reaktionszentrum der Purpurbakterien. Nach der Ladungstrennung am primären Donor P 680 wird das Elektron über ein

Phaeophytinmolekül (Phaeo) zum Chinon Q_A weitergeleitet. Der terminale Akzeptor ist ein weiteres Chinonmolekül (Q_B). Die Rolle des zwischen den beiden Chinonen liegenden Eisenions (Fe^{2+} ist noch nicht geklärt (G. Renger, 1992). Q_B kann zweifach reduziert werden und löst sich, nach der Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma, aus dem PS II-Komplex (Hydrochinon). Es diffundiert als in der Membran frei beweglicher Elektronencarrier zum Cyt-b₆f-Komplex. Dort werden die Elektronen an den Cyt-Komplex abgegeben und die Protonen ins Lumen freigesetzt.

Die Bindungsstelle von Q_B im PS II ist der Ansatzpunkt für Inhibitoren der Photosynthese (S. Izawa, 1977). DCMU (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) z.B., als Vertreter der Gruppe der Phenylharnstoffe, blockiert den Elektronentransfer von Q_A nach Q_B . Aus der Gruppe der Nicht-Phenylharnstoffe mit gleichem Wirkort sei hier noch Atrazin genannt, da es bis vor einigen Jahren noch als Herbizid verwendet wurde und aufgrund seiner Stabilität zu Problemen bei der Trinkwasserreinheit führt.

Aus zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen sind die Transferzeiten für Anregungsenergie und Elektronen in den PS II-artigen Photosystemen zumindest größenordnungsmäßig bekannt (Abb. 2.8). Eine genauere Angabe ist bei einigen Zwischenschritten nicht möglich, da *in vitro*-Messungen nicht ohne weiteres auf die *in vivo*-Situation übertragen werden können (siehe dazu auch Kap. 3.4.4).

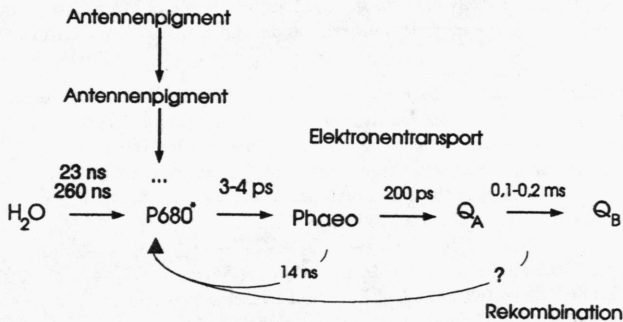


Abb. 2.8: Transferzeiten im PS II bei Raumtemperatur (Quellen: siehe Text)

Die charakteristische Zeit für den Anregungseinfang nach einer Blitzlichtanregung der Antenne wurde bei PS II-Präparationen mit einer Antennengröße von 60 bis 80 Chl a-Molekülen mit 150 – 200 ps bestimmt (W. Leibl et al., 1989). Mit einer Zeitkonstante von etwa 3 ps wird der elektronisch angeregte primäre Donor $P680^*$ oxidiert und Phaeophytin reduziert (M.R. Wasielewsky et al., 1989). Der Transfer von Phaeophytin zu Q_A geschieht mit einer Halbwertszeit von 300 – 500 ps (G.H. Schatz et al., 1987; H.J. Eckert und G. Renger, 1988). 1992). Für die Reduktion von Q_B wird in der Literatur eine Zeit von 100 – 200 μ s angegeben (P. Mathis and A.W. Rutherford, 1987). Eine ausführlichere Zusammenstellung der verschiedenen experimentellen Ergebnisse findet sich in einem Übersichtsartikel von G. Renger (1992).

Die Reduktion des primären Donors geschieht, je nach S-Zustand des wasserspaltenden Mn-Clusters (siehe unten), mit Zeitkonstanten zwischen 23 und 260 ns (H.T. Witt et al., 1986).

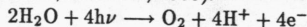
Für die Rekombinationszeiten im PS II gibt es derzeit keine gesicherten Literaturwerte, da sich die Zuordnungen der gemessenen Fluoreszenzabklingzeiten zu den verschiedenen Rückreaktionen widersprechen. Als einigermaßen gesichert gilt momentan für die Reaktion $P\ 680^+ \text{ Phaeo}^- \rightarrow P\ 680^* \text{ Phaeo}$ eine Zeit von 25 bis 40 ns (G. Renger, 1992).

Wasserspaltender Mn-Cluster

Wie bereits oben erwähnt, ist die früher übliche Unterscheidung zwischen PS II und 'wasserspaltendem Komplex' nach neueren Erkenntnissen nicht mehr haltbar. Eine zentrale Rolle bei der Wasserspaltung spielt ein Cluster von vier Mn-Atomen. Die in verschiedenen Veröffentlichungen vorgebrachte Theorie seiner Ligandierung mit einem 33 kDa-Protein (z.B. J. Barber, 1989), das an der lumenalen Seite der D_1/D_2 -Proteine angelagert ist, muß nach dem derzeitigen Stand des Wissens in Zweifel gezogen werden. So konnte z.B. bei PS II-Präparationen und Mutanten, denen dieses 33 kDa-Protein fehlte, trotzdem eine O_2 -Entwicklung nachgewiesen werden (M. Miyao et al., 1987; R.L. Burnap und L. Sherman, 1991). Diese und andere Untersuchungen führen zu der Vorstellung, daß das PS II als wasserspaltendes Photosystem gedacht werden muß. Abb. 2.7 gibt einen dem Stand der Diskussion entsprechenden Modellvorschlag für die Lokalisierung des Mn-Clusters wieder. Eine ausführliche Diskussion der experimentellen Befunde findet sich bei A.W. Rutherford et al. (1992).

Nach einer Ladungstrennung im Reaktionszentrum von PS II liefert der wasserspaltende Mn-Cluster die für die Rückreduktion des oxidierten primären Donors ($P\ 680^+$) erforderlichen Elektronen. Der Transfer zum $P\ 680^+$ erfolgt dabei über ein Tyrosinradikal.

Während Absorptionsexperimente zeigten, daß $P\ 680^+$ nach einem Lichtblitz sofort wieder reduziert wird, ergaben Messungen des Sauerstoffausstoßes nach Blitzlichtexperimenten folgendes Reaktionsschema (P. Joliot, A. Joliot, 1968):



Nach jeweils vier Lichtblitzen wird ein Molekül O_2 freigesetzt. Von Kok et al. (1970) wurde daraufhin ein Modell vorgestellt, bei dem über fünf Zwischenzustände (S-Zustände, S_0 bis S_4) in einem Kreisprozeß die Akkumulation von vier positiven Ladungen und die Spaltung von Wasser abläuft. Der Mn-Cluster fungiert dabei als 'Speicher' für zumindest einige dieser positiven Ladungen und dürfte die Bindungsstelle für die Wassermoleküle darstellen. Eine genaue Zuordnung ist derzeit nicht möglich, da sowohl die Lokalisierung, als auch die Ligandierung dieser Mn-Atome nicht geklärt ist.

Die einzelnen S-Zustände sind bei Dunkelheit unterschiedlich stabil (E. Holland, 1991). Der S_4 -Zustand ist auch bei Belichtung ein sehr kurzlebiger Zwischenzustand und die S_3 - und S_2 -Zustände zerfallen durch Rekombination mit Elektronen von Q_A und Q_B mit Halbwertszeiten von einigen Sekunden bis Minuten. Dies führt zu Oszillationen der verzögerten Fluoreszenz (A.W. Rutherford et al., 1984). Bei Dunkelheit sind nur die S_0 - und S_1 -Zustände stabil.

Das Photosystem II kommt in den Chloroplasten der Pflanzen in mehreren Modifikationen vor (Govindjee, 1990). Die wichtigste Unterscheidung erfolgt durch die Einteilung in $PS\ II_a$ -

und PS II_β-Zentren. PS II_α entspricht dem oben vorgestellten Typ (Antennen mit einigen hundert Chl a, Vorkommen in gestapelten Bereichen der Thylakoidmembran). Im Gegensatz dazu weisen PS II_β-Zentren folgende Charakteristika auf:

- kleinere Antennengröße
 - größerer Anteil an langwelligen Chl a-Formen
 - Vorkommen in den ungestapelten Bereichen des Membransystems
 - größere Rücktransferrate von Phaeo⁻ zu P 680⁺, d.h. schnelleres Fluoreszenzabklingen
- Darüberhinaus befindet sich ein Anteil von ca. 40% aller PS II-Zentren in einem inaktiven Zustand, d.h. führen keine Ladungstrennung aus.

Auf weitere Heterogenitäten von Photosystem II soll hier nicht mehr eingegangen werden, da sie die in dieser Arbeit untersuchten primären Anregungs- und Ladungstransferprozesse nicht beeinflussen. Eine Übersicht darüber findet sich bei Govindjee (1990).

2.4 Photosystem I

Die Übertragung eines Elektrons aus der Spaltung von H₂O auf NADP⁺ in höheren Pflanzen erfordert die Hintereinanderschaltung von zwei Photosystemen. Das im obigen Abschnitt beschriebene Photosystem II bewirkt den Transfer von Elektronen aus der Wasserspaltung zum Cyt-b₆-f-Komplex. Dort werden sie an Plastocyanin, einen löslichen Carrier, übergeben und zum Photosystem I (PS I) transportiert. Das PS I läßt sich damit als lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase charakterisieren. Durch Ferredoxin werden Elektronen zu einem Enzym weitergeleitet, an dem die Reduktion von NADP⁺ katalysiert wird.

2.4.1 Aufbau und Funktion

Der exakte dreidimensionale Aufbau von PS I ist noch nicht bekannt. Im Gegensatz zum Reaktionszentrum bei den Purpurbakterien konnten Röntgenstrukturuntersuchungen noch nicht mit genügender Auflösung durchgeführt werden (R.C. Ford et al., 1987; I. Witt et al., 1987). Das beste Ergebnis erzielten bisher N. Kraus et al. (N. Kraus et al., 1993), die die drei-dimensionale Struktur mit 6 Å Auflösung bestimmten.

Bei der Bestimmung der für den Ladungstransport funktionellen Gruppen ist man vollständig auf Informationen aus 'indirekten' Experimenten (Absorption, Fluoreszenz, ESR etc.) und auf Analogieschlüsse von verwandten Systemen angewiesen. Abb. 2.9 gibt den derzeitigen Stand der Diskussion wieder.

Der PS I-Gesamtkomplex besteht aus dem eigentlichen Photosystem I mit 10 oder 11 Polypeptiden und einem Lichtsammelkomplex (LHC I) (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991). In dem ersteren sind bei Cyanobakterien und eukaryontischen Pflanzen ca. 100 bis 200 Chl a-Moleküle als Antennenpigmente eingelagert.

Der Kernkomplex wird von drei Proteinen gebildet: den Untereinheiten Ia, Ib und VII. Aus den Aminosäuresequenzen konnten ihre Massen mit 83.0, 82.4 und 8.9 kDa bestimmt werden. Die beiden großen Untereinheiten weisen auch bei verschiedenen Pflanzen und Cyanobakterien eine sehr große Sequenzhomologie von teilweise über 90% auf (P. Reilly, N. Nelson, 1988). Sie unterstreicht die spezieübergreifende Bedeutung ihrer Funktion als Bindungsstellen für die funktionellen Gruppen im PS I.

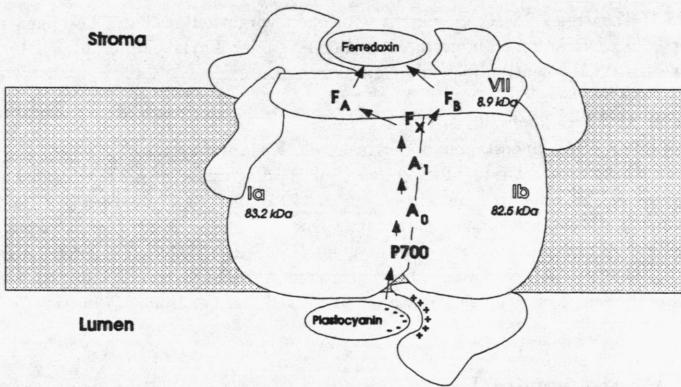


Abb. 2.9: Strukturmodell vom Kernbereich des PS I (nach: J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991)

Die Proteine Ia und Ib werden durch Gene der Chloroplasten codiert. Sie enthalten einen großen Anteil hydrophober Aminosäuren, was auf die Ausbildung helikaler Strukturen schließen läßt. Dies wird durch die Untersuchungen von N. Kraus et al. (1993) gestützt, die mindestens acht transmembrane Helizes vorfanden. Sie weisen in ihrer Anordnung eine zweifache Rotationssymmetrie auf. Die Symmetrieachse verläuft durch den Eisen-Schwefel-Cluster F_X. Die Untereinheiten enthalten ca. 40 bis 50 Chl a-Moleküle, die die Kernantenne bilden. Aus der Elektronendichteverteilung in einem etwa 20 Å breiten Spalt zwischen Ia und Ib schloßen sie, daß dort die funktionellen Gruppen für den Ladungstransfer lokalisiert sind.

Der primäre Donor – P 700

Der primäre Donor im Photosystem I wird nach dem zu beobachtenden lichtinduzierten Ausbleichen bei 700 nm als P 700 bezeichnet (B. Kok, 1956). Im angeregten Zustand gibt er ein Elektron an den nächsten Akzeptor ab. Die Rückreduktion erfolgt über Elektronen von Plastocyanin, das an der lumenalen Seite des Kernkomplexes bindet.

Bei der Frage nach der chemischen Natur des primären Donors besteht inzwischen Konsens darüber, daß es sich um Chl a-Moleküle handelt (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991). Spekulationen darüber, ob P 700 durch eine monomere Chl a Enolform (M.R. Wasielewski et al., 1981) gebildet wird, konnten durch FTIR-Messungen widerlegt werden (E. Nabedryk et al., 1990). Unklar ist jedoch, welche Rolle Chl a' (C10 Epimer von Chl a) spielt, das in geringer Menge als Bestandteil des Kernkomplexes identifiziert wurde (T. Hiyama et al., 1987).

Die ESR-Linienbreite des P 700⁺-Kations weist gegenüber der eines Chl a⁺-Kations eine Verschmälerung um etwa den Faktor $\sqrt{2}$ auf (J.R. Norris et al., 1971). In Übereinstimmung mit CD-Spektren wurde dies als Hinweis auf einen Dimer gewertet. Demgegenüber stehen ENDOR-Messungen an P 700⁺ (P.J. O'Malley, G.T. Babcock, 1984) und Analysen des spinpolarisierten Triplettzustandes (A.W. Rutherford, J.E. Mullet, 1981), die auf eine monomere Struktur von P 700 hindeuten. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß P 700 im Grundzustand als Dimer vorliegt, und im angeregten Zustand die positive Ladung nur

auf ein Molekül konzentriert ist (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991). Winkelaufgelöste ESR-Untersuchungen an gerichteten PS I-Proben ergaben, daß P 700 senkrecht zur Membranebene ausgerichtet ist (A.W. Rutherford, P. Sétif, 1990).

Der primäre Akzeptor – A_0

Vom primären Elektronenakzeptor (A_0) wird angenommen, daß es sich um ein Chlorophyll a-Molekül handelt. Diese Aussage stützt sich auf Ergebnisse aus zeitaufgelösten Absorptionsmessungen, die ein Maximum der Absorptionsänderung bei 690 nm ergaben. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei photoakkumulierten Differenzspektren (oxidiert minus reduziert) unter Dauerbelichtung eine Absorptionsänderung bei 670 nm. Diese wird inzwischen damit erklärt, daß bei den für Photoakkumulation erforderlichen experimentellen Bedingungen (Dauerbelichtung bei stark reduzierenden Bedingungen) durch A_0 ein benachbartes Chl a-Molekül reduziert wird, das ein Absorptionsmaximum bei 670 nm besitzt (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991).

Der sekundäre Akzeptor – A_1

Der sekundäre Akzeptor A_1 wird durch ein Phyllochinonmolekül (Vitamin K_1) gebildet. Vitamin K_1 kommt mit einer Stöchiometrie von zwei Molekülen pro P 700 im Photosystem vor (H.-U. Schoeder, W. Lockau, 1986). Die Zuordnung von A_1 als Vitamin K_1 gründet sich vor allem auf folgende Experimente:

- a) Phyllochinon kann durch Behandlung mit Diethyläther aus dem PS I herausgelöst werden. Das Experiment ergab daraufhin eine Unterbrechung des Elektronentransfers zu $NADP^+$. Dieser Vorgang war jedoch reversibel, d.h. eine Zugabe von Vitamin K_1 führte zur Wiederherstellung des Elektronentransfers (J. Biggins, P. Mathis, 1988; S. Itoh, M. Iwaki, 1988).
- b) ESR- und Absorptionsspektroskopie zeigten, daß unter stark reduzierenden Bedingungen und hoher Beleuchtungsintensität der Ladungstransfer zu den terminalen Akzeptoren unterbrochen ist. Auch nach Dunkeladaption bleibt dieser Zustand erhalten. Dies wurde mit einer Doppelreduktion des Phyllochinons zum Phyllochinol erklärt. Das Redoxpaar Semiphylllochinon/Phyllochinol besitzt ein höheres Redoxpotential als das Phyllochinon/Semiphylllochinon-Paar und unterbricht damit den Ladungstransfer (P. Sétif, H. Bottin, 1989; H. Bottin, P. Sétif, 1991).

Die Identität von A_1 als ein Phyllochinon war lange Zeit unklar, da bei verschiedenen Extraktionsexperimenten trotzdem der lineare Ladungstransfer unbeeinflusst blieb (S. Itoh et al., 1987; K. Ziegler et al., 1987). Es stellte sich jedoch heraus, daß unter bestimmten Bedingungen (v. a. bei tiefen Temperaturen oder nach UV-Bestrahlung) A_1 , in einer Art 'bypass' durch Aminosäurereste, umgangen werden kann und es zu direktem Ladungsaustausch zwischen A_0 und terminalen Akzeptoren kommt (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991).

Eisen-Schwefel-Zentrum Fe_x

ESR-Experimente unter stark reduzierenden Bedingungen wiesen schon Mitte der 70iger Jahre auf die Existenz eines dritten Fe-S-Clusters im Photosystem I hin (M.C.W. Evans et al., 1975). Die große Linienbreite des Signals und die ungewöhnlich hohe Mikrowellensättigungscharakteristik zeigten jedoch Abweichungen zu bisher bekannten Fe-S-Komplexen. Vergleichende Studien der Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen wiesen auf jeder

der beiden großen Untereinheiten mindestens zwei Cysteine nach, die als Ligandierungspartner in Frage kämen. Ihre relativen Positionen blieben sowohl bei Cyanobakterien, als auch bei höheren Pflanzen erhalten. Sie befinden sich in einem relativ hydrophilen Abschnitt der Peptidsequenz, was auf eine Lokalisierung in der Nähe eines aus der Membran herausragenden Teiles des Proteins schließen läßt.

Seine Lage auf bzw. zwischen den beiden großen Untereinheiten von PS I und seine Identität wurden erst geklärt, als präparativ die Abtrennung der kleinen Untereinheit durch LDS gelang (J.T. Warden und J.H. Golbeck, 1986; J.H. Golbeck et al., 1987), da die beiden übrigen Eisen-Schwefel-Zentren F_A und F_B (siehe unten) den meßtechnischen Zugang erschwerten. Erste Hinweise für einen FeS-Cluster auf den beiden großen Untereinheiten aus stöchiometrischen Untersuchungen (H. Sakurai und A. San Pietro, 1985) sowie Absorptions- und ESR-Experimenten (J.H. Golbeck und J.M. Cornelius, 1986) konnten in der Folge durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (W. Lockau et al., 1987; J. Wachtveitl et al., 1987). Ebenso war es nunmehr durch EXAFS- und Mössbaueruntersuchungen möglich, ihn als einen 4Fe-4S-Cluster zu identifizieren (A.E. McDermott et al., 1989; V. Petrouleas et al., 1989), nachdem diese Zuordnung wegen der oben erwähnten Besonderheiten nicht sicher war.

Ob F_X *in vivo* tatsächlich am linearen Elektronentransfer zu den endständigen Akzeptoren direkt beteiligt ist, wird inzwischen in Frage gestellt. Bei tiefen Temperaturen kann nur eine geringe Effektivität des Ladungstransfers zu F_A und F_B festgestellt werden. Nur ca. 10–15% des vorhandenen F_X wird durch einen sättigenden Lichtblitz reduziert (P. Sétif et al., 1984). Photoakkumulationsexperimente an Präparaten, denen die kleine Untereinheit fehlt, weisen auf einen Einfluß der reduzierten Zentren F_A^- und F_B^- auf die anderen Komponenten des Transferweges hin (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991), d.h. alle früheren Experimente, die bei stark reduzierenden Bedingungen erfolgten, müßten neu überdacht werden.

Die terminalen Akzeptoren – F_A und F_B

Die letzten gebundenen Akzeptoren im PS I werden als F_A und F_B bezeichnet. Vor allem ESR-Untersuchungen legten den Schluß nahe, daß es sich dabei um zwei 4Fe-4S-Zentren handeln mußte (R. Malkin, A.J. Bearden, 1971; A.J. Bearden, R. Malkin, 1972; R. Cammack, M.C.W. Evans, 1975). Sie befinden sich auf einem separaten, 8,9 kDa schweren Protein, das auf der stromalen Seite quer über den beiden großen Untereinheiten liegt (J.H. Golbeck, 1987). Es wird ebenfalls durch ein Chloroplastengen codiert, was seine Bedeutung für den Ladungstransfer unterstreicht. An Präparaten, bei denen das Protein abgelöst wurde (z.B. durch Harnstoff), konnte gezeigt werden, daß F_A und F_B für die Reduktion von $NADP^+$ notwendig sind (J.A. Hanley et al., 1992). Inwieweit beide allerdings sequentiell arbeiten ist unklar, da die selektive Zerstörung eines der Zentren den Elektronentransfer zum Ferredoxin nicht wesentlich beeinflusste (T. Fujii et al., 1990; H. Sakurai et al., 1991). Daraus wird geschlossen, daß beide Zentren parallel als Elektronendonatoren für lösliches Ferredoxin fungieren können. Ferredoxin transportiert die Elektronen zu einem Enzymkomplex, an dem $NADP^+$ reduziert wird.

Neben der hier beschriebene Rolle von Photosystem I im linearen Elektronentransport bei höheren Pflanzen wird in verschiedenen Lehrbüchern (z.B. L. Stryer, 1988) noch ein zyklischer Ladungstransport postuliert, bei dem ausschließlich PS I und der Cyt- b_6 -f-Komplex beteiligt sind. Dieser hätte nur die Bildung von ATP zum Ziel. Ein derartiger Prozeß läßt sich jedoch *in vivo* unter normalen Umweltbedingungen nur schwer nachweisen. Nur bei sehr hohen

Lichtintensitäten, die eine Inaktivierung der LHC-II Phosphorylierung zur Folge hatten, gelang es O. Canaani et al. (1989) einen zyklischen Elektronentransport durch photoakustische Messungen nachzuweisen.

2.4.2 Transferzeiten

Die Abbildungen 2.10 und 2.11 zeigen die für Photosystem I bisher ermittelten Zeiten für den Elektronentransfer und die Rekombinationsreaktionen bei Raumtemperatur und bei 77 K. In den Darstellungen sind die einzelnen Komponenten der Akzeptorkette nach ihrem Redoxpotential angeordnet.

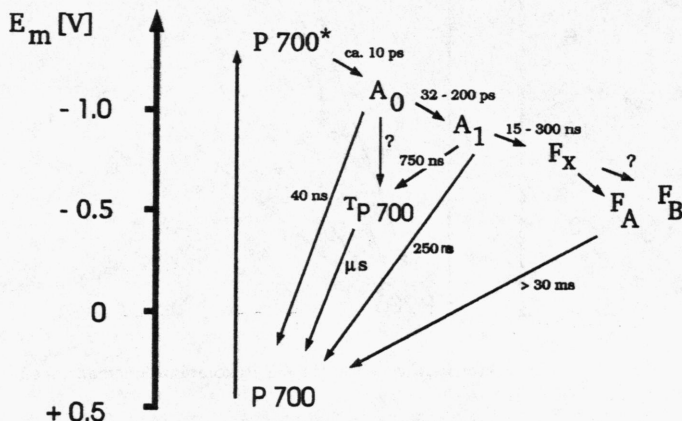


Abb. 2.10: Charakteristische Zeiten für Ladungstransfer und Rekombination im PS I bei Raumtemperatur

Bei Fluoreszenzexperimenten fanden T.G. Owens et al. (1987) eine sehr schnelle Abklingkomponente mit einer Zeit von 15 bis 45 ps. Aus ihrer Abhängigkeit von der Antennengröße schlossen sie, daß es sich dabei um die Lebenszeit der Anregung in der Antenne handeln müsse. H.-W. Trissl et al. (1987) konnten zudem durch photoelektrische Messungen eine Variation dieser Abklingzeit mit der Anregungsintensität nachweisen. Bei niedrigen Intensitäten (weniger als 10^{14} Photonen pro Laserpuls) verlängerte sie sich auf 90 ± 15 ps. Die Ladungstrennung im PS I erfolgt innerhalb von ca. 10 ps (Abb. 2.10) (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991). Für den nächsten Schritt, den Transfer des Elektrons zum Akzeptor A_1 , wurden Werte zwischen 30 und 200 ps ermittelt (J.H. Golbeck, D.A. Bryant, 1991; A.W. Rutherford, P. Heathcote, 1985). Auch für die Reduktion von F_X existieren widersprüchliche Zeitkonstanten. Unter stark reduzierenden Bedingungen (d.h. F_A und F_B sind chemisch vorreduziert) ergaben sich Zeiten zwischen 15 ns (P. Mathis, P. Sétif, 1988) und 300 ns (K. Brettel, 1990).

Für die Rekombinationsreaktionen bei Raumtemperatur werden folgende Zeitkonstanten als realistisch erachtet:

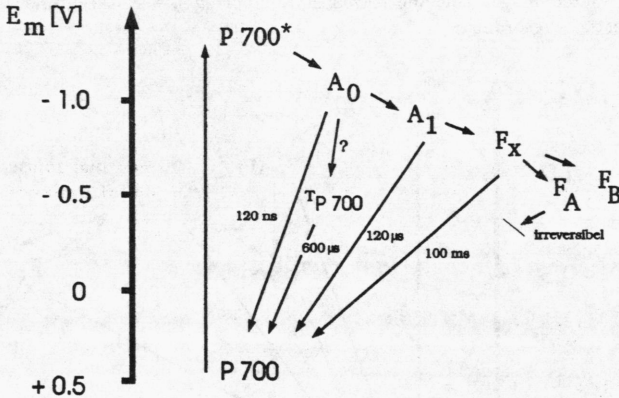
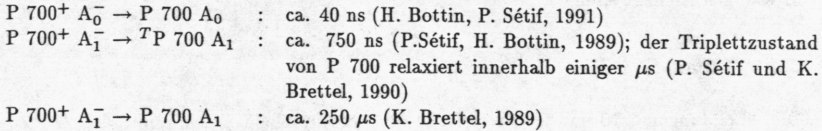


Abb. 2.11: Charakteristische Zeiten für die Rekombinationsreaktionen im PS I bei 77 K

Bei Abkühlung auf Temperaturen um 77 K verlängern sich diese Zeiten drastisch (Abb. 2.11).

Die hier aufgeführten Transfer- und Rekombinationszeiten weisen eine große Variation auf. Die Gründe dafür liegen zum einen in der Natur des Untersuchungsobjektes, zum anderen in den experimentellen Methoden:

- Photosystem I und Photosystem II sind sich in ihren optischen Eigenschaften (Absorption, Fluoreszenz) sehr ähnlich. Eine meßtechnische Trennung der verschiedenen Signale ist bei *in vivo* Experimenten nicht eindeutig möglich. Zudem beträgt die Fluoreszenzintensität von PS I nur etwa 6 bis 10% derjenigen von PS II (N. Mimuro et al., 1987; N.K. Boardman et al., 1966). Daraus ergibt sich die Forderung, Untersuchungen an PS I-Präparationen durchzuführen. Die Ergebnisse derartiger *in vitro* Experimente können jedoch nur mit einer gewissen Vorsicht auf die *in vivo* Situation übertragen werden, da z.B. Veränderungen der Proteine durch die Präparation oder den Einsatz von Redoxsubstanzen nicht auszuschließen sind. Als Beispiel soll hier nur der Hinweis auf die oben beschriebenen Unsicherheiten bezüglich der Rolle von F_x im linearen Elektronentransport genügen.

- Anregungstransfer und Ladungstrennung laufen auf einer so extrem kurzen Zeitskala ab, daß ein experimenteller Zugang nur über optische Methoden möglich ist. Die dabei zu beobachtenden Abklingvorgänge weisen, bedingt durch die Komplexität des Objektes, ein multiexponentielles Verhalten auf. Zu ihrer Beschreibung werden teilweise bis zu fünf Exponentialfunktionen herangezogen (M. Hodges et al., 1987), deren Aussagekraft, d.h. Korrelation mit tatsächlich ablaufenden Vorgängen, nicht eindeutig ist. Auch die Anwendung eines 'global analysis'-Ansatzes (A.R. Holzwarth, 1987) erleichtert diese Korrelation nicht immer.

2.4.3 Gemeinsamkeiten von PS II und PS I

Neben Pflanzen und Purpurbakterien besitzen noch eine Reihe von anderen Organismen photosynthetische Reaktionszentren: Heliobakterien und grüne photosynthetisierende Bakterien (Chlorobiaceae und Chloroflexaceae). Auf der Basis von Sequenzvergleichen der 16s-rRNA konnte nachgewiesen werden, daß die grünen Schwefelbakterien (Chlorobium) keine enge Verwandtschaft mit den grünen nicht-Schwefelbakterien (Chloroflexus) aufweisen (C.R. Woese, 1987).

Das Reaktionszentrum von Chloroflexus ähnelt sehr stark dem von Purpurbakterien, während die Chlorobiaceae in ihrer Akzeptorkette eine große Analogie zum PS I aufweisen (W. Nitschke et al., 1990). Die Donorseite entspricht jedoch der bei den Purpurbakterien: eine Cytochrom-Untereinheit befindet sich auf der Lumenseite des Reaktionszentrums.

Die einzelnen Formen von Reaktionszentren wurden bisher in zwei Gruppen eingeteilt:

- a) PS I-artige RZ: Photosystem I der Pflanzen, RZ bei Heliobakterien und bei grünen Schwefelbakterien (Chlorobium)
- b) PS II-artige RZ: Photosystem II der Pflanzen, RZ bei Purpurbakterien und Chloroflexus

Die oben erwähnte funktionelle Verwandtschaft der Chlorobiaceae sowohl mit Purpurbakterien, als auch mit PS I, und eingehendere Untersuchungen über den Aufbau von PS I weisen auf größere Gemeinsamkeiten der verschiedenen Reaktionszentren hin, als bisher vermutet wurde.

Dazu zählen vor allem:

- Der Kernkomplex besteht aus zwei Untereinheiten.
- In nahezu allen Reaktionszentren (Ausnahme: PS II) wird der primäre Donor durch ein Dimer gebildet, dessen räumliche Orientierung z.B. bei Purpurbakterien und beim PS I sehr ähnlich ist.
- Die große Homologie der beiden großen Untereinheiten im PS I lassen auch hier einen spiegelsymmetrischen Aufbau vermuten. Diese These wird gestützt durch das Vorkommen zweier Phytylchinone.
- Den stromalen Verknüpfungspunkt der beiden Proteinuntereinheiten bildet Eisen, in einem Fall (PS II-artig) in Form eines Eisenatoms, im anderen Fall (PS I-artig) durch einen Fe-S-Cluster.

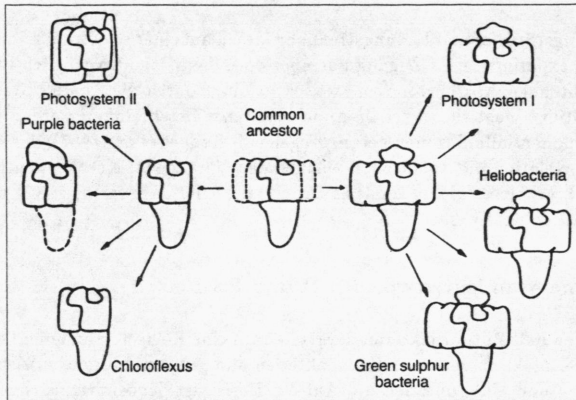


Abb. 2.12: Hypothetische evolutionäre Verwandtschaft zwischen den bisher bekannten Formen von Reaktionszentren (aus W. Nitschke, A.W. Rutherford, 1991)

Diese und eine Reihe weiterer, vor allem molekularbiologischer Gemeinsamkeiten führten zur Hypothese, daß es einen gemeinsamen Vorfahren in der Evolutionsgeschichte gebe, der die gemeinsamen Charakteristika aufweist (W. Nitschke und A.W. Rutherford, 1991). Abb. 2.12 zeigt diesen vermuteten 'common ancestor' als Strukturmodell und die Weiterentwicklungen zu den heute bekannten Formen von Reaktionszentren.

Kapitel 3

Proben

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung des Anregungs- und Ladungstransfers im PS II und PS I mit zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie.

Ein Teil der Experimente wurde an der Grünalge Chlorella vulgaris, dem Cyanobakterium Anabaena variabilis, sowie an Chloroplasten von Spinat durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der Proben sind in den ersten beiden Abschnitten dieses Kapitels beschrieben.

Die Messungen an diesen Proben ergaben jedoch u.a., daß die Fluoreszenzanteile von PS I nicht zu erfassen sind, wenn beide Photosysteme in den Proben vorliegen (s. Kap. 5). Daher wurden auch Untersuchungen an PS I-Reaktionszentren durchgeführt. Die Präparation von PS I aus Spinat und A. variabilis wird im dritten Abschnitt geschildert.

Der letzte Abschnitt listet die verwendeten Inhibitoren und Redozsubstanzen auf und charakterisiert kurz ihre Wirkungsweisen.

3.1 Algen und Cyanobakterien

Seit der Einführung von *Chlorella* als Untersuchungsobjekt durch O. Warburg (1919) spielen Reinkulturen einzelliger Grünalgen, und in der Folge auch von Cyanobakterien, wegen ihrer einfachen Handhabbarkeit und der Kontrollierbarkeit der Kulturbedingungen eine wesentliche Rolle in der Photosyntheseforschung. Die hier benutzten Arten besitzen einen mit höheren Pflanzen vergleichbaren Photosyntheseapparat (P.H. Raven, et al., 1988).

3.1.1 Charakterisierung und Aufzucht

Chlorella vulgaris

Zur Gattung *Chlorella* gehören unbewegliche, globuläre, einzellige Grünalgen mit einem Durchmesser von 5-10 μm . Sie kommen freilebend sowohl im Süßwasser, als auch im Salzwasser und im Boden vor, und vermehren sich schnell durch die Bildung von 2 bis 16 Autosporen innerhalb einer Mutterzelle. Sie besitzen einen glockenförmigen Chloroplasten, der an der Zellwand anliegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm *C. vulgaris* verwendet, der von der Algensammlung des pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen bezogen wurde.

Die Aufbewahrung der Stammkultur erfolgte auf Agarplatten (s. Anhang), die regelmäßig steril überimpft wurden.

Für die Experimente wurden sogenannte statische Kulturen angesetzt. Die Anzucht der Algen erfolgte dabei mit Knopp'scher Nährlösung (s. Anhang) in 750 ml Algenflaschen photoautotroph bei Dauerlicht und 295 K. Über das Begasungsrohr strömte von unten kontinuierlich, über Glaswolle gefilterte und mit 2.5 % CO₂ angereicherte Luft ein. Diese sorgte sowohl für eine ausreichende Kohlenstoffzufuhr, als auch für eine ständige Durchmischung der Algen, so daß alle Zellen gleichmäßig mit einer Intensität von 6000 Lux belichtet wurden. Als Lichtquelle dienten vier Leuchtstoffröhren (Osram, 36 W, Universalweiß).

Bei einer statischen Kultur werden während des Wachstums der Algen keine Nährstoffe zu- oder Stoffwechselprodukte abgeführt. Die Algen wachsen dabei so lange, bis ein Nährstoff- oder Lichtmangel das Wachstum begrenzt. Die Wachstumskurve weist eine sigmoide Gestalt auf, in der mehrere Phasen unterschieden werden: die Anlauf- (oder lag-) Phase, eine exponentielle (oder log-) Phase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase. Bei vielen Algen sind Zellgröße und Zellproteingehalt in der log-Phase konstant, die Kultur besteht gewissermaßen aus 'Standardzellen'. Die in dieser Arbeit verwendeten Algen wurden während der log-Phase abgeerntet.

Das Absorptionsspektrum von *C. vulgaris* (Abb. 3.1), aufgenommen mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Fa. Kontron, Modell Uvikon 860), zeigt zwei ausgeprägte Maxima bei 440 und 685 nm. Diese entsprechen den elektronischen Übergängen $S_0 \rightarrow S_2$ und $S_0 \rightarrow S_1$ der Chl a-Moleküle (s. Kap. 2.2.2). Daneben sind an den Schultern bei 480 und 650 nm die Absorptionsbanden der analogen Übergänge von Chl b zu erkennen. Zwischen 530 und 640 nm liegt ein Minimum der Absorption vor, in diesem Bereich gibt es keine Antennenpigmente.

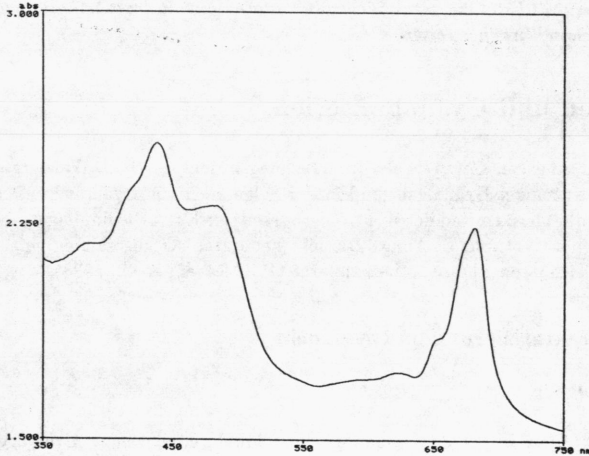


Abb. 3.1: Absorptionsspektrum von *C. vulgaris* bei 295 K

Anabaena

Die Gattung *Anabaena* gehört zu den Prokaryonten (Bakterien), und zwar zur Gruppe der Cyanobakterien. Im Unterschied zu den Eukaryonten besitzen die Prokaryonten z.B. keinen echten, von einer Kernhülle umgebenen Zellkern, sowie keine komplexen Chromosomen. Die Cyanobakterien wurden früher fälschlicherweise den Algen zugeordnet, daher ihre alte Bezeichnung 'Blaualgen'.

Die Zellen bei *Anabaena* sind oval mit einem Durchmesser von 5 - 10 μm . Sie enthalten keinen Chloroplasten, sondern die Thylakoide liegen frei im Cytoplasma. Bei der Zellteilung wachsen neue Plasmamembranen und eine neue Zellwand vom Rande auf die Mitte zu.

Die in dieser Arbeit benutzte Gattung *A. variabilis* wurde von Dr. W. Lockau am Institut für Botanik der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. *A. variabilis* besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung von Heterocysten, vergrößerten Zellen mit einer vielschichtigen Zellwand, in denen die Thylakoide konzentrisch oder netzartig angeordnet sind. Sie enthalten ausschließlich PS I. Dieser Umstand erlaubt eine Vereinfachung der PS I-Präparation.

Das Absorptionsspektrum von *A. variabilis* (Abb. 3.2) zeigt die für Chl a charakteristischen Maxima bei 440 und 685 nm. Im Gegensatz zum entsprechenden Spektrum bei *C. vulgaris* (Abb. 3.1) tritt jedoch im Bereich 550 bis 650 nm ein weiteres Maximum auf, das den Pigmenten Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin in den Phycobilisomen zugeordnet werden kann (siehe auch Kap. 2.2.2).

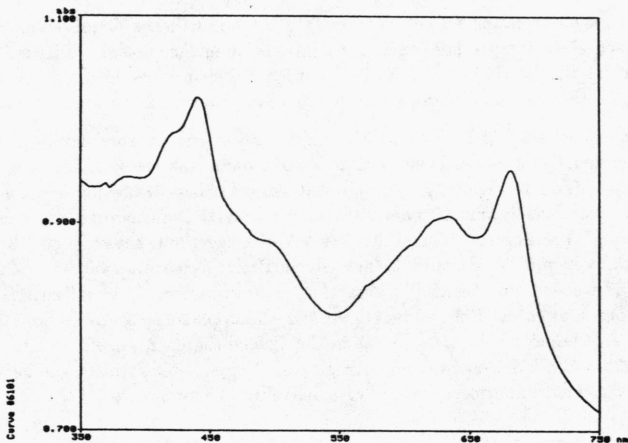


Abb. 3.2: Absorptionsspektrum von *A. variabilis*

3.1.2 Probenherstellung

Die Proben wurden in Glasröhrchen von ca. 3 cm Länge und einem Durchmesser von 0.5 cm abgefüllt. Diese Röhrchen konnten aus Einwegpipetten durch Abschmelzen selbst hergestellt werden.

Bei ersten Vorversuchen zeigte sich, daß die Zellen in den Proben sedimentierten. Dadurch nahm im Verlauf einer Messung die Konzentration der Zellen im Lichtstrahl, und damit auch die Fluoreszenzintensität, ab.

Um dies zu verhindern, wurde die Algensuspension durch einen Glasfaserrundfilter (Fa. Schleicher & Schüll, Glasfaserrundfilter No. 6) filtriert und ein Teilstück des Filters mit dem Algenrückstand in ein Probenröhrchen mit Nährlösung gegeben.

Die Chlorophyllkonzentrationen der Proben wurden nach der Methode von Nusch (DIN, 1986) photometrisch bestimmt. Durch entsprechende Verdünnung wurde in den Proben die Chlorophyllkonzentration auf 4-8 $\mu\text{g/ml}$ (bei *A. variabilis*), bzw. auf 10-20 $\mu\text{g/ml}$ (bei *C. vulgaris*) eingestellt. In diesen Bereichen ergab sich keine Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften. Bei Werten von über 14 $\mu\text{g Chl a/ml}$ bei *A. variabilis* konnte dagegen eine Zunahme der Fluoreszenz zwischen 710 und 760 nm mit steigender Konzentration festgestellt werden (Probst, M., 1991). Diese überproportionale Betonung der langwelligen Emission ist auf Reabsorption innerhalb der Probe und anschließende, rotverschobene Emission zurückzuführen. Eine Diskussion dieses Effektes findet sich in Abschnitt 3.3.

Für die Experimente bei Temperaturen unter 273 K wurden die Proben mit 50 Vol % Glycerin versetzt, um ein Gefrieren der Lösungen zu verhindern.

3.2 Chloroplasten

Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte aus Spinat, der von örtlichen Gemüsehändlern bezogen wurde, nach einer entsprechenden Praktikumsanleitung für Biologiestudenten (Praktikumsanleitung B1-Block, 1991). Die Blätter werden dabei in einer isotonischen Lösung homogenisiert und die intakten Chloroplasten durch Filtration und Zentrifugation isoliert.

Die Präparation erfolgt bei 273 K. Alle Gefäße und Geräte müssen vorher auf diese Temperatur gekühlt werden. 40 g gewaschener Spinat werden dann mit 150 ml Lösung Iso-Stack (siehe Anhang) im Mixer zerkleinert und grobe Anteile mit einem Siebleinen herausfiltriert. Das Homogenat wird anschließend 40 s bei 4000 g zentrifugiert. Die Chloroplasten sind dann im Pellet enthalten. Dieses wird, je nach weiterem Versuchsverlauf, entweder mit 3 ml der Lösung Iso-Stack, oder mit der gleichen Menge Glycin-Puffer aufgenommen.

Die Chloroplasten wurden vor Beginn der Versuche frisch präpariert, da ihre Haltbarkeit auf einige Stunden beschränkt ist. Ein Sedimentieren der Chloroplastensuspension konnte nicht festgestellt werden, daher wurde diese direkt in die Probenröhrchen abgefüllt. Die in den Proben eingestellten Chl-Konzentrationen betrugen ca. 6 $\mu\text{g/ml}$. Sie wurden, wie bei J.T.O. Kirk (1968) beschrieben, photometrisch in Acetonextrakten bestimmt.

3.3 Photosystem I

3.3.1 Präparation

PS I aus Spinat wurde nach der Präparationsanleitung von H.-U. Schoeder (1983) selbst isoliert. Diese Arbeiten konnten am Institut für Botanik (Universität Regensburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hauska durchgeführt werden.

Die PS I-Proben aus *A. variabilis* wurden von Dr. K. Ziegler (Arbeitsgruppe Dr. W. Lockau, Inst. für Botanik, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Die Präparation ist

bei Ziegler, K. (1991) beschrieben. Sie verläuft in den wichtigsten Schritten analog zur Präparation aus Spinat, daher soll diese im folgenden kurz beschrieben werden.

Die Präparation wird bei 4° C durchgeführt. Zuerst werden Spinatblätter in einer isotoni-schen Lösung homogenisiert und die ganzen Chloroplasten durch Filtration und Zentrifuga-tion isoliert (siehe oben). Zum Aufbrechen werden die Chloroplasten in ein hypotonisches Medium aufgenommen und anschließend die Membranfragmente zweimal gewaschen. Nach jedem dieser Arbeitsschritte werden unerwünschte Anteile in der Lösung durch Zentrifuga-tion abgetrennt, das Pellet wieder aufgenommen und homogenisiert ('Pottern').

Die vorgereinigten Membranen werden mit 2 % Triton X-100 solubilisiert. Triton ist ein De-tergenz mit dem die Proteine aus den Membranen gelöst werden. Das Solubilisat wird auf eine mit TT-Puffer (siehe Anhang) äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Das Eluat wird fraktioniert und von jeder Fraktion der relative Chl-Gehalt und der Gehalt an P 700 photometrisch bestimmt. Die Fraktionen mit dem größten P 700-Gehalt werden vereinigt. Zur Erhöhung der Konzentration kann an dieser Stelle ein Dialysesschritt eingeschoben werden. Das gereinigte PS I-Reaktionszentrum erhält man nach einer 20-stündigen Ultrazentrifugation auf einem Saccharosedichtegradienten. PS I bildet dabei eine Bande bei ca. 20 % Saccharose. Diese wird entnommen und, nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff, bei 253 K aufbewahrt.

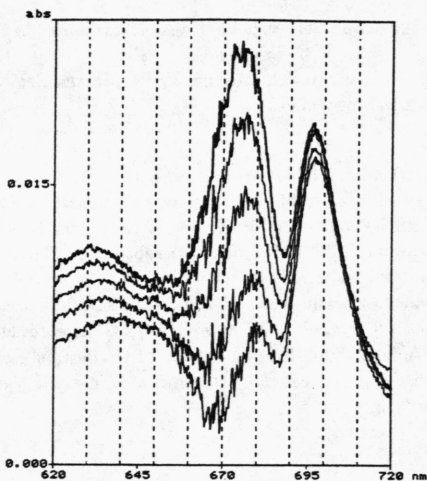


Abb. 3.3: Redox-Differenzspektrum einer P 700-Probe
die einzelnen Absorptionsspektren wurden in der Reihenfolge von oben
nach unten jeweils im Abstand von 30 s aufgenommen

Die einzelnen Arbeitsschritte werden überprüft, indem jeweils der Chl a-Gehalt bzw. der Gehalt an P 700 bestimmt werden. Die Überprüfung des P 700-Gehaltes geschieht durch optische Redox-Differenzspektroskopie (T.V. Marso, und B. Kok, 1980) nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und Reduktion mit Natriumascorbat (Abb. 3.3). Aus der Höhe des Maximums bei ca. 700 nm läßt sich mit dem Extinktionskoeffizienten von $64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(T. Hiyama, und B. Ke, 1972) der Gehalt an P 700 berechnen. In Abb. 3.3 ist außerdem ein Ausbleichen bei 670 nm zu beobachten. Dieses wird durch die Oxidation von Antennenchlorophyllen verursacht.

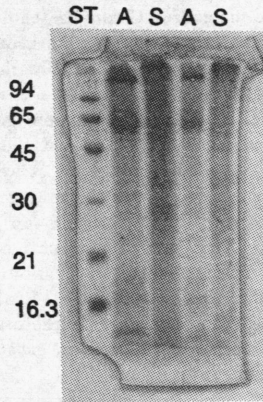


Figure 3.4: SDS-Gelelektrophorese von PS I aus *A. variabilis* (A) und Spinat (S);

Spalte (ST): Molekulargewichtsstandard (die Massen der Standardproteine sind in kDa angegeben)

Die endgültige Überprüfung der Probenreinheit erfolgt mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS: Sodiumdodecylsulfate). Abb. 3.4 zeigt einen Ausschnitt des Gels mit den in dieser Arbeit verwendeten PS I-Proben (A für *A. variabilis*, S für Spinat), zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (ST). Bei beiden Proben sind Banden von etwa 60 kDa zu erkennen. Sie entsprechen den zwei großen Untereinheiten von PS I (Ia und IB, siehe Abb. 2.9), die ein apparentes Molekulargewicht von ca. 60 kDa besitzen. Eine weitere, schwach erkennbare Bande bei 10 kDa kann der Untereinheit VII zugeordnet werden (siehe Abb. 2.9). Diese trägt die terminalen FeS-Komplexe von PS I. Bei der Spinatprobe sind außerdem noch Banden zwischen 21 und ca. 35 kDa zu sehen, die auf Verunreinigungen durch Antennenkomplexe hinweisen.

3.3.2 Probenherstellung

Die Chl a-Konzentrationen der aus der Präparation erhaltenen Proben betrugen 0.5 mg/ml (PS I aus Spinat) und 2.8 mg/ml (PS I aus *A. variabilis*). Um ein häufiges Auftauen und Einfrieren dieser 'Stammproben' zu vermeiden, wurden von jeder Probe verdünnte Lösungen verteilt auf mehrere Eppendorf-Cups mit einer Chl a-Konzentration von 0.1 mg/ml angefertigt. Die Verdünnung erfolgte dabei entweder mit TT-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.1, mit 0.1% Triton), oder mit Glycin-Puffer (pH 10.5, Fa. Sigma).

Die verdünnten Lösungen wurden bei 253 K gelagert. Die endgültige Probenherstellung erfolgte mit diesen verdünnten Lösungen, wobei die Endkonzentration auf Werte zwischen 50 und 70 µg/ml eingestellt wurde. Von den Oxidations- und Reduktionsmitteln wurden

an jedem Versuchstag frische Stammlösungen hergestellt, um Artefakte durch nachlassende Aktivitäten auszuschließen. Entsprechende Mengen von PS I-Lösung und der Redoxmittel wurden in einem Eppendorf-Cup zusammenpipettiert, mit der errechneten Menge an Puffer aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Bei den Experimenten unter hochreduzierenden Bedingungen wurden die Proben vor der Zugabe von Natriumdithionit durch Überblasen mit Argon sauerstofffrei gemacht, da Natriumdithionit mit Sauerstoff reagiert.

Die fertigen Proben wurden anschließend in abgeflachte Glasröhrchen (Innenmaße: Höhe * Breite * Tiefe: 35mm * 4mm * 0.5mm) abgefüllt und in den Kryostaten abgesenkt.

Bei allen Arbeitsvorgängen wurde darauf geachtet, daß die Proben nicht über 4° C erwärmt wurden.

Bei Experimenten mit unterschiedlichen Probenröhrchen ergaben sich Veränderungen im spektralen Verhalten. Abb. 3.5 zeigt dies exemplarisch für eine Verdoppelung der Probenstärke. Das Spektrum der dickeren Probe weist auf der langwelligen Flanke eine deutlich höhere Intensität auf, während die kurzwellige Flanke und das Maximum gleich bleiben. Dies ist auf Reabsorbtionseffekte zurückzuführen. Die Fluoreszenz von Antennenpigmenten bei kurzen Wellenlängen wird innerhalb der Proben von langwellig absorbierenden Pigmenten aufgenommen und rotverschoben reemittiert. Ein derartiger Effekt wurde bereits von J.C. Goedheer (1964) beschrieben. Da er eine Verfälschung der tatsächlichen Intensitätsverhältnisse darstellt, wurden alle Untersuchungen an Proben mit einer Dicke von 0.3 mm vorgenommen.

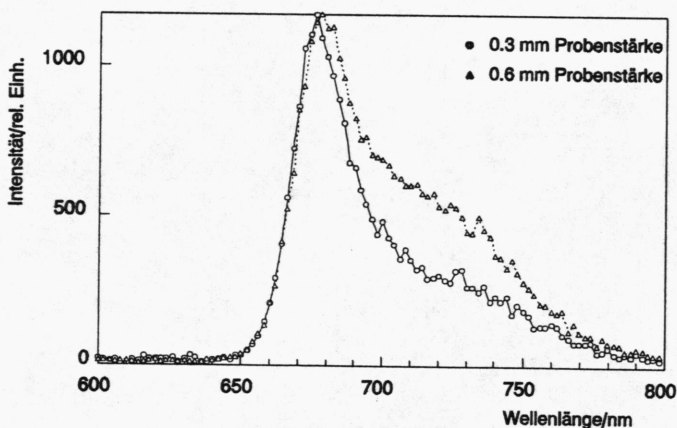


Abb. 3.5: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von *A. variabilis* bei unterschiedlicher Dicke der Proben; T = 243 K, 200 ps Anregungspuls, Beobachtungszeitraum: 100 ns (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

3.4 Inhibitoren und Redoxsubstanzen

Im folgenden werden die verwendeten Redoxsubstanzen und Inhibitoren aufgelistet.

- DCMU (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylharnstoff, Diuron) ist einer der bekanntesten Hemmstoffe des Elektronentransfers in Photosynthesezentren. Es unterbricht die Ladungsweitergabe von Q_A nach Q_B im PS II. Bereits bei einem Verhältnis von 0.5 μg DCMU auf 100 μg Chl *a* wird der Elektronentransfer vollständig unterbrochen (Izawa, S., 1977).
- Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ist ein starkes Reduktionsmittel (Redoxpotential -460 mV bei pH 10.5). Bei der Benutzung muß jedoch beachtet werden, daß sich das Redoxpotential von Natriumdithionit mit fallenden pH-Werten in Richtung positiver Potentiale verschiebt.
Außerdem kann Natriumdithionit auch den in der Luft vorhandenen Sauerstoff reduzieren und verliert dabei an Aktivität. Daher wurde es unter Luftabschluß in einem evakuierten Exsikkator aufbewahrt.
- Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, rotes Blutlaugensalz) wurde als Oxidationsmittel benutzt. Sein Redoxpotential beträgt +430 mV. Damit kann der primäre Donor im PS I oxidiert werden.

Kapitel 4

Experimenteller Aufbau

Eine der Zielsetzungen dieser Arbeit war der Aufbau eines Meßplatzes für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie im ps-Zeitbereich. Aus den Eigenschaften der Untersuchungsobjekte (z.B. Absorptionswellenlängen, Fluoreszenzintensität, etc.; s. Kap. 2) ergaben sich bestimmte Anforderungen an diesen Meßplatz.

Im folgenden Kapitel wird dieser Meßplatz vorgestellt. Schwerpunkte bilden dabei die Darstellung des Lasersystems (modengekoppelter Argonionenlaser, Abschnitt 4.1) und die Signalerfassung mit Zeit-Amplituden-Konversion und anschließender Histogrammierung (Abschnitt 4.4). Im Abschnitt 4.3 wird ein bereits vorhandener Meßplatz kurz geschildert, mit dem die Messungen im μ s- und ms-Zeitbereich vorgenommen wurden.

4.1 Erzeugung kurzer Pulse mit einem Argonionenlaser

Prinzipiell stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung, mit einem Laser kurze Lichtpulse zu erzeugen (Weber, Herziger, 1972):

1. Pulsbetrieb des Lasers
2. Gütemodulation (Q-Switch)
3. Modenkopplung

Bei dem hier benutzten Argonionenlaser wurde der Pulsbetrieb durch aktive Modenkopplung verwirklicht (P.W. Smith, 1970). Es lassen sich dadurch im Vergleich zu den beiden anderen Methoden höhere Leistungsdichten im Puls und kürzere Halbwertsbreiten erzeugen. Das Grundprinzip und die gewählte technische Realisierung werden im folgenden kurz wiedergegeben (Abschnitt 4.1.1). Die Variation der Pulswiederholrate geschah mit Hilfe eines Cavity-Dumpers, der in Abschnitt 4.1.2 vorgestellt wird.

4.1.1 Modenkopplung

Im cw - Betrieb eines Lasers schwingen in der Regel eine Vielzahl von Longitudinalmoden ω_n an. Der Frequenzabstand zwischen zwei Moden beträgt dabei:

$$\Delta\omega = \frac{2\pi c}{2L} \quad (4.1)$$

L = Länge der Cavity

An einem willkürlich gewählten Ort $x = 0$ innerhalb der Cavity ergibt sich für das elektrische Feld $E(t)$ als Funktion der Zeit:

$$E(t) = A \sum_{n=0}^{N-1} e^{i(\omega_n t + \delta_n)} \quad (4.2)$$

N = Anzahl der Moden

δ_n = Phasen der jeweiligen Moden

Für die Intensität folgt daraus:

$$I = N A^2 \quad (4.3)$$

Die Ausgangsintensität des Lasers ist damit ebenfalls proportional zu $N A^2$.

Der modengekoppelte Fall liegt vor, wenn es gelingt, alle Longitudinalmoden des Lasers in eine feste Phasenbeziehung zueinander zu bringen, d.h. $\delta_n = \delta$. Für $E(t)$ gilt dann:

$$E(t) = A e^{i\delta} \sum_{n=0}^{N-1} e^{i\omega_n t} \quad (4.4)$$

Die Intensität im modengekoppelten Fall ergibt sich nach Umformung zu:

$$I(t) = A^2 \frac{\sin^2 \frac{N\Phi}{2}}{\sin^2 \frac{\Phi}{2}} \quad (4.5)$$

mit $\Phi = \Delta\omega t$

Es kommt zur Ausbildung sehr kurzer Pulse, für die gilt:

$$\text{maximale Intensität:} \quad I_m = N^2 A^2 \quad (4.6)$$

$$\text{Pulshalbwertsbreite:} \quad \Delta t = \frac{2L}{Nc} \quad (4.7)$$

$$\text{Abstand der Pulse:} \quad T = \frac{2L}{c} \quad (4.8)$$

Das Intensitätsmaximum im Puls liegt um den Faktor N über der Intensität im ungekoppelten Fall (Gl. 4.6). Die Pulsbreite sinkt mit der Zahl der überlagerten Moden (Gl. 4.7). Je größer die Bandbreite des Laserübergangs ist, umso kürzer und intensiver werden die Pulse.

Bei dem zur Verfügung stehenden Argonionenlaser (Typ 2025) der Fa. Spectra - Physics wird die Modenkopplung durch eine Modulation der Cavitygüte mit der Frequenz $\omega = \frac{2\pi c}{2L}$ realisiert (Modell 342A Ultra-Stable Mode Locking System, Fa. Spectra - Physics).

Zu diesem Zweck wird ein Prisma in der Nähe des hochreflektierenden Endspiegels in die Cavity eingesetzt. Eine von außen angelegte Hochfrequenz erzeugt über einen an die Stirnseite aufgeklebten Piezokristall eine Ultraschallwelle im Prisma (Abb. 4.1). Bei geeigneter Wahl der Hochfrequenz werden die akustischen Eigenschwingungen des Prismas angeregt. Die damit verbundenen periodischen Dichteschwankungen erzeugen entlang des Kristalls periodische Veränderungen des Brechungsindex, die auf die ankommende elektromagnetische Welle wie ein Gitter wirken. Anhand von Abb. 4.1 soll das Prinzip verdeutlicht werden.

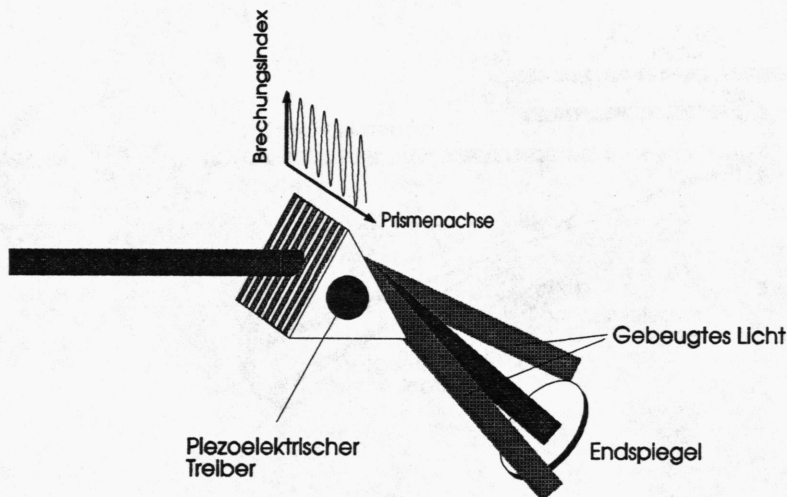


Abb. 4.1: Akustooptische Modenkopplung mit einem Prisma

Nur zu den Zeiten des Nulldurchgangs der stehenden Welle im Prisma wird Licht unbeeinflusst durchtreten können. Zu allen anderen Zeiten wird das Licht beim Durchtreten durch Beugungsverluste geschwächt. Diese Beugungsverluste werden mit dem Frequenzunterschied zweier benachbarter Longitudinalmoden moduliert. Für eine bestimmte Mode werden dadurch Seitenbänder mit den Frequenzen der benachbarten Moden erzeugt und diese gezwungen, mit gleicher Phase zu schwingen. Nach einer endlichen Anzahl von Umläufen ist die Kopplung aller Longitudinalmoden erreicht.

Da die Resonanzfrequenz des Prismas bei einer bestimmten Temperatur vorgegeben ist, muß die Cavitylänge des Lasers so darauf abgestimmt werden, daß die reziproke Umlaufzeit eines Lichtpulses genau dieser Frequenz entspricht. Unter Berücksichtigung der zwei in entgegengesetzter Richtung in der Cavity herumlaufenden Lichtpulse ergibt sich die tatsächliche Wiederholfrequenz des Lasers als das Doppelte der angelegten Hochfrequenz.

4.1.2 Variation der Wiederholrate mit einem Cavity-Dumper

Wie aus der oben angeführten Theorie der Modenkopplung ersichtlich wird, ist der Abstand zweier Pulse durch Gl. 4.8 fest vorgegeben. Eine Veränderung der Wiederholrate wird erst durch den Einbau eines sogenannten Cavity-Dumpers in den Laser möglich. Dieser lenkt selektiv einzelne Pulse erst nach dem n -ten Durchlauf aus dem ansonsten geschlossenen Resonator heraus.

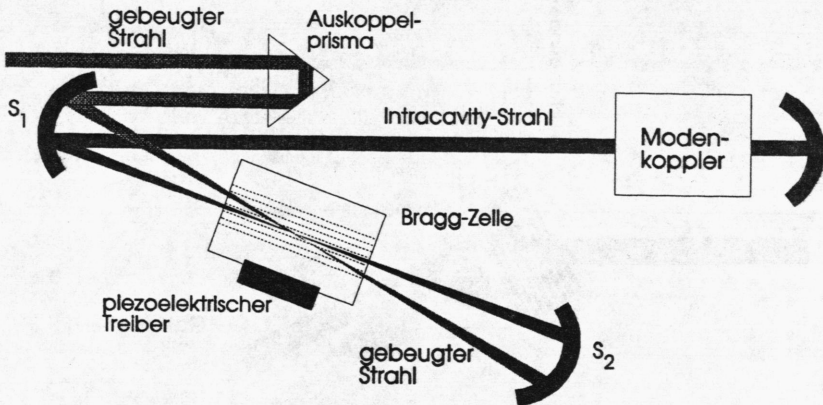


Abb. 4.2: Cavity - Dumper

Das Funktionsprinzip ist in Abb. 4.2 erläutert. Der normale Auskoppelspiegel des Lasers wird durch die Cavity - Dumper - Einheit ersetzt (Modell 344S High - Efficiency Cavity Dumper, Fa. Spectra - Physics). Dadurch ergibt sich ein geschlossener Resonator ('gefaltete Cavity'). Das aktive Element ist, ähnlich wie beim Modenkoppler, eine Bragg - Zelle, in der von außen über einen Piezokristall eine Ultraschallwelle erzeugt wird. Durch die Hohlspiegel S_1 und S_2 wird der Laserstrahl auf die Bragg - Zelle fokussiert.

Im Brennpunkt erzeugt eine durchlaufende Ultraschallwelle eine periodische Schwankung des Brechungsindex, die eine Beugung des Laserstrahles zur Folge hat. Bei geeigneter Dimensionierung der Abstände und Durchmesser der Spiegel S_1 und S_2 läuft der abgebeugte Teilstrahl nicht in die Cavity zurück, sondern wird über das Auskoppelprisma aus dem Laser gelenkt.

In Verbindung mit einem Modenkoppler muß für eine exakte Synchronisation beider Einheiten gesorgt werden, damit in der Bragg - Zelle des Cavity - Dumpers nur dann eine Schallwelle erzeugt wird, wenn der gewünschte, zu selektierende Puls ankommt.

Ein Vorteil des Cavity - Dumpers gegenüber extern angebrachten Elementen zur Pulsselektion (z.B. Chopperrad) besteht darin, daß die Energie des Lasers durch die geschlossene Cavity im Resonator gespeichert bleibt. Damit ist bei einem modengekoppelten Puls eine Erhöhung der Pulsenergie um den Faktor 30 möglich.

Ein Cavity-Dumper läßt sich auch bei einem Laser im cw-Betrieb nutzen. Er wird dabei extern über einen Pulsgenerator getriggert. Damit können Pulse mit variabler Wiederholrate und einer minimalen Halbwertsbreite von 10 ns erzeugt werden.

Da die Untersuchungen in dieser Arbeit ein relativ großes Zeitfenster abdecken, wurde als

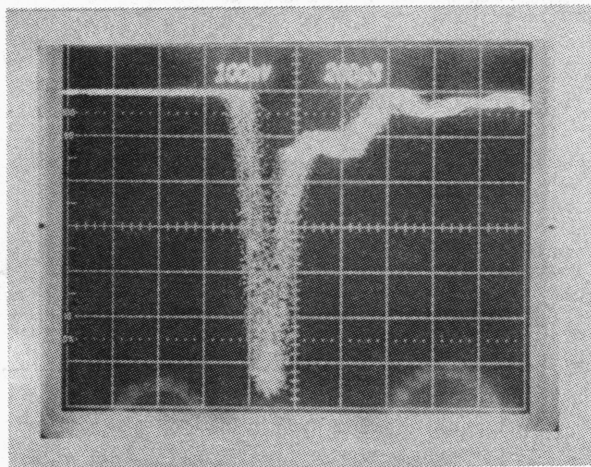


Abb. 4.3: Laserpuls nach Modenkopplung, detektiert mit einer schnellen Si - Photodiode (Anstiegszeit ca. 30 ps, Fa. Spectra - Physics, Modell 403B), fotografiert von einem Tektronix - Oszillographen 7904 mit Samplingeinschub 7S11 und Triggereinschub 7T11

Anregungslichtquelle sowohl der Argonionenlaser im cw-Betrieb in Verbindung mit einem Cavity-Dumper benutzt, als auch das sogenannte Combo - System aufgebaut, d.h. ein modengekoppelter Argonionenlaser mit Cavity - Dumper. Im ersten Fall wurden die Pulshalbwertsbreiten zwischen 10 ns und 50 ns variiert. Die Wiederholfrequenzen betrugen typischerweise 10 kHz. Die Triggerung erfolgte extern über einen Pulsgenerator (Hewlett Packard, Modell 8013A).

Für den zweiten Fall ist das Ergebnis in Abb. 4.3 gezeigt. Der Laser wurde auf der 496,5 nm - Linie betrieben. Die hier realisierte Cavitylänge führte zu einer Modenkopplerfrequenz von 41,0295 MHz. Im abgebildeten Fall betrug die Wiederholfrequenz durch den Einsatz eines Cavity-Dumpers tatsächlich 41,0295 kHz. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, lag die Pulshalbwertsbreite bei < 200 ps.

Die Experimente wurden mit Wiederholraten zwischen 0.4 und 41.0 kHz durchgeführt. Eine Messung der Pulsenergie vor dem Eintritt des Laserpulses in den Kryostaten ergab einen Wert von 2 nJ.

In Verbindung mit den in Kap. 3 angegebenen Chl a-Konzentrationen der Proben läßt sich mit der Poisson-Formel abschätzen, wie lange es dauert bis ein Reaktionszentrum ein zweites Mal angeregt wird. Bei einer Wiederholrate von 41 kHz liegt diese Zeitdauer in der Größenordnung von einigen Sekunden. Da innerhalb dieser Zeit alle Rekombinationsreaktionen in den Photosystemen abgeschlossen sind (s. Kap. 2.3 und 2.4.2), kann bei den Proben

ohne Zusätze eine Akkumulation von Elektronen in der Akzeptorkette ausgeschlossen werden. Damit ist sichergestellt, daß sich die Proben vor jedem Laserpuls im gleichen Oxidationszustand befinden.

4.2 Aufbau der optischen Komponenten

Abb. 4.4 zeigt die optischen Komponenten, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

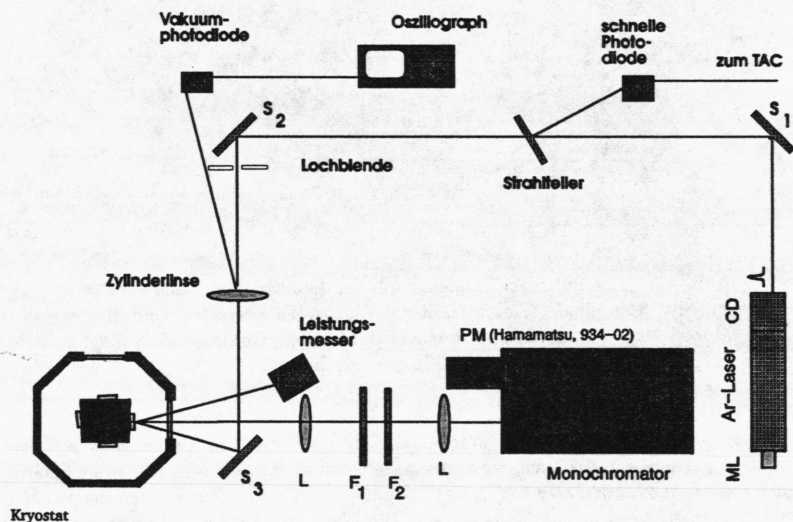


Abb. 4.4: Apparatur für zeitaufgelöste Spektroskopie: optischer Aufbau
S: Spiegel, L: Linse, F: Filter, TAC: Zeit-Amplituden-Konverter (s. Abschnitt 3.4.1)

Die Anregung erfolgte wie bereits oben beschrieben durch einen Argon-Ionenlaser im Pulsbetrieb (200 ps-Pulse oder ns-Pulse). Die eingestellte Wellenlänge war 496,5 nm. Dieser Wert liegt genügend weit vom Maximum der Soret-Bande von Chlorophyll a (siehe Abb. 2.5) entfernt, damit eine auch in der Tiefe gleichmäßige Durchstrahlung der Probe gegeben ist.

Über einen Strahlteiler (Glasplättchen) wurde ein Teil des Laserstrahles auf eine schnelle Photodiode (Spectra-Physics, Modell 403 B, Signalanstiegszeit 50 ps) gelenkt. Sie lieferte den Startimpuls für den Zeit-Amplituden-Konverter (siehe Kap. 4.4.1).

Um eine bessere Ausleuchtung der Probe und damit eine höhere Fluoreszenzintensität zu erhalten, wurde der Laserstrahl durch eine Zylinderlinse aufgeweitet.

Der Spiegel S_3 lenkte den Anregungsstrahl unter einem solchen Winkel auf die Probe, daß Reflexionen von den Kryofenstern und den Probengefäßen nicht in den Detektionswinkel fielen. Einer dieser Reflexe wurde benutzt, um mit einem Leistungsmeßgerät (Coherent, Optical Power Meter Mod. 212) die Ausgangsleistung des Lasers zu kontrollieren. Ein angeschlossener x-t-Schreiber lieferte ein Leistungsprotokoll für jede Messung.

Bei niedrigen Wiederholraten (400 Hz) dauerten die Messungen in der Regel zwei bis fünf Stunden. Um Veränderungen in der Pulsform auch während einer laufenden Messung beobachten zu können, wurde ein Rückreflex der Zylinderlinse ausgenutzt. Dieser fiel auf eine Vakuumphotodiode. Das Signal konnte nach Verstärkung auf einem Oszillographen (Hameg, HM 705) dargestellt werden.

Die Probenröhrchen wurden mit Klebebändern an einem quaderförmigen Metallblock befestigt und in den Kryostaten abgesenkt. Der verwendete Kryostat (Fa. Leybold) ließ sich im Bad- oder Durchflußbetrieb nutzen. Die Temperaturregelung erfolgte über einen Regelkreis durch Heizen und/oder durchströmendes kaltes Heliumgas. Für $T > 200\text{ K}$ wurde die Temperatur mit einem Thermoelement bestimmt, das oberhalb der Probe befestigt war. Für $T < 200\text{ K}$ erfolgte die Temperaturmessung mit einem Kohle-Glas-Widerstand, der von einer Konstantstromquelle (1 bis $100\text{ }\mu\text{A}$ nach Herstellervorschrift) versorgt wurde. Die Genauigkeit der Temperaturmessung lag bei ca. 0.3 K . Der Kryostat war in einer Aufhängung befestigt, die eine motorgetriebene Verschiebung in drei Raumrichtungen ermöglichte.

Die Emission der Probe wurde durch zwei Linsen im passenden Öffnungsverhältnis 1:9 auf den Eingangsspalt eines 1m-Gittermonochromators (Spex 1704, f-Zahl: 9) abgebildet. Zwischen die beiden Linsen konnte zu Justierzwecken ein Fernrohr geklappt werden. In Verbindung mit der verschiebbaren Kryostatenaufhängung und einer fernbedienbaren Feinverstellung des letzten Umlenkspiegels war somit eine exakte Ausrichtung des Laserstrahles auf die Probe und der Emission auf den Monochromator-Eintrittsspalt möglich.

Wegen der sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute der PS-I-Reaktionszentren wurde ein Teil der Messungen mit einem lichtstärkeren 32 cm-Monochromator (Jobin-Yvon HR 320, f-Zahl: 4,5) durchgeführt.

Die Detektion erfolgte mit einem GaAs-Photomultiplier (Hamamatsu R943-02), der mit 1600 V Kathodenspannung im Photonenzählmodus betrieben wurde. Durch eine Peltierkühlung konnte die Dunkelrate auf ca. 20 bis 50 Impulse/s gesenkt werden. Ein Kantenfilter (Schott, OG 570/2.0) zwischen den beiden Linsen des Abbildungssystems schützte den Photomultiplier vor Streulicht vom Laser. An dieser Stelle erfolgte auch die für Messungen mit dem Zeit-Amplituden-Konverter gegebenenfalls notwendige Abschwächung des Emissionslichtes durch Graufilter (siehe auch Kap. 4.4.1).

4.3 Datenerfassung bei Messungen im μs -Bereich

Diese Apparatur diente zur Untersuchung des Zeitbereiches von 100 ns bis einige ms nach der Laseranregung. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus wurde sie aber auch bei den ps-Experimenten zu Kontrollmessungen und für Übersichtsspektren benutzt.

Kernstück dieses Aufbaus ist ein 64 - Kanal-Zähler (Eigenbau F.S. Heimerl (F.S. Heimerl, 1977)) mit einer in mehreren Stufen variierbaren Kanalbreite von 100 ns bis 100 ms. In diesen wurden die Photomultipliersignale eingelesen.

Die Steuerung einer Messung und das Sichern der Meßdaten erfolgt durch einen Olivetti M28 Rechner mit einem Meßprogramm, das dankenswerterweise von F. Wunsch übernommen werden konnte (F. Wunsch, 1987).

Anhand von Abb. 4.5 werden im folgenden die Abläufe beim Messen einer Kurvenschar $I(\lambda, t)$ dargestellt.

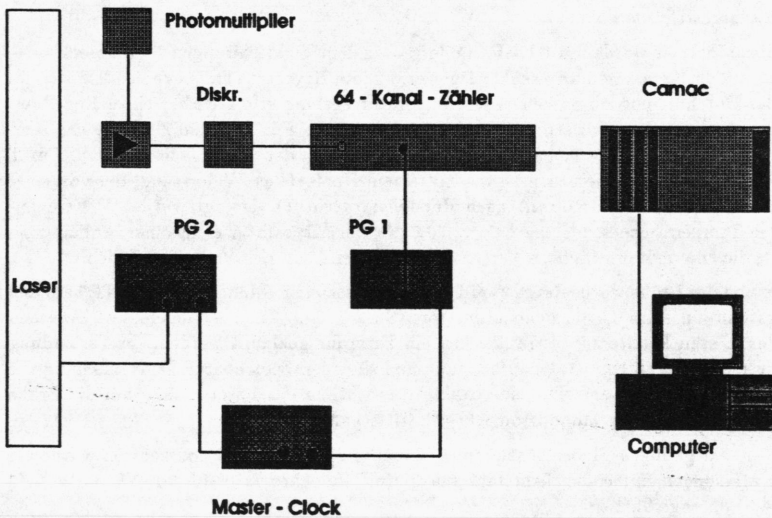


Abb. 4.5: Zeitaufgelöste Spektroskopie im μs -Bereich: Datenerfassung und Sicherung

1. Die gewünschte Detektionswellenlänge wird über einen CAMAC-Schrittmotortreiber (Joerger SMC-L) eingestellt.
2. Der 64-Kanal-Zähler wird vorbereitet. Die Kanalbreite (min. 100 ns) und die Wiederholrate für die Messung bei einer Wellenlänge müssen vorgegeben werden. Beide sind in mehreren Stufen unabhängig voneinander wählbar.
3. Ein Pulsgenerator (HP 8013A), der auf die gewünschte Laser-Repetitionsrate eingestellt ist, fungiert als Masterclock. Er startet zwei weitere Pulsgeneratoren (PG 1: HP 8013A, PG 2: HP 8013B)

4. PG 1 startet den 64-Kanal-Zähler. Die Signale des Photomultipliers werden nun zeit-aufgelöst in den Kanälen des Zählers registriert.
5. PG 2 gibt zeitverzögert das Triggersignal für den Cavity-Dumper. Die Verzögerung entsprach in der Regel 5 Zeitkanälen des Zählers. Dadurch ist die Erfassung der Dunkelrate bei jeder Messung möglich. Die Ansteuerung des Cavity-Dumpers mit einem extra Pulsgenerator ermöglichte es, die Pulsbreite separat einzustellen.
6. Im 64-Kanal-Zähler wird nun der zeitliche Verlauf der Emission aufgenommen.
7. Die Schritte 3 bis 6 werden wiederholt, bis die am Zähler eingestellte Anzahl der Messungen erreicht ist. Der Inhalt der 64 Kanäle wird ausgelesen und im Rechner abgelegt.
8. Dieser Ablauf wiederholt sich, bis der im Meßprogramm vorgegebene Wellenlängenbereich durchfahren ist.

Die so erhaltene Kurvenschar $I(\lambda, t)$ konnte an einem zweiten Rechner (Olivetti M28) ausgewertet werden (Auswertprogramm: F. Wünsch, 1987).

4.4 Signalerfassung im ps-Bereich

Für zeitaufgelöste Spektroskopie im ps-Bereich läßt sich der in Abschnitt 3.3 beschriebene Aufbau nicht verwenden, da die derzeit erreichbaren minimalen Kanalbreiten für Vielkanalzähler in der Größenordnung von 10 bis 100 ns liegen. Unterhalb dieses Zeitbereiches kommen üblicherweise zwei Methoden zum Einsatz: Streak-Kamera oder Zeit-Amplituden-Konversion. Die Benutzung einer Streak-Kamera empfiehlt sich vor allem bei großen Fluoreszenzintensitäten. Voruntersuchungen zeigten jedoch, daß dies bei den hier untersuchten Proben nicht gegeben ist. Daher wurde der Meßaufbau mit einem Zeit-Amplituden-Konverter realisiert (A.E.W. Knight et al., 1973; G. Rojas et al., 1987). Im folgenden werden die wichtigsten Komponenten erläutert.

4.4.1 Zeit-Amplituden-Konversion und Histogrammierung

Für die Wahrscheinlichkeit, ein Fluoreszenzphoton zur Zeit t zu registrieren, gilt:

$$W(t) \sim I(t)$$

$W(t)$: Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines Fluoreszenzphotons zur Zeit t

$I(t)$: Intensität der Fluoreszenzemission zur Zeit t

Dieser Zusammenhang wird bei einem Meßaufbau mit einem Zeit-Amplituden-Konverter (engl.: Time - to - Amplitude - Converter, TAC) ausgenutzt. Anhand von Abb. 4.6 soll dies erläutert werden.

Mit einem TAC wird die Zeit gemessen, die nach einem Laserpuls vergeht, bis das erste Fluoreszenzphoton am Photomultiplier eintrifft. Über eine schnelle Photodiode (s. Abb. 4.4) wird bei jedem Laserpuls eine Spannungsrampe gestartet. Der Photomultiplier liefert das

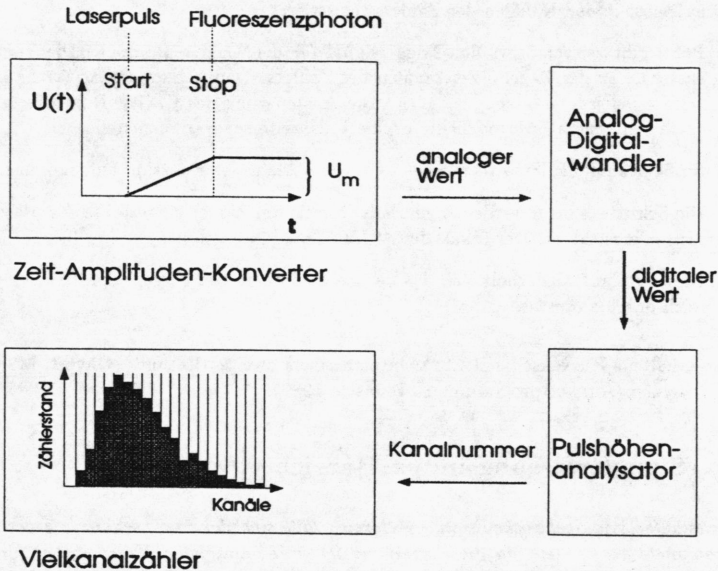


Abb. 4.6: Zeit-Amplituden-Konversion und Histogrammierung

Stopsignal, sobald das erste Fluoreszenzphoton detektiert wird. Der erreichte Spannungswert ist proportional zu verstrichener Zeit. Er wird digitalisiert und in einem Pulshöhenanalysator (PHA) einem bestimmten Kanal eines Vielkanalzählers zugewiesen. Der Wert dieses Kanals wird um eins erhöht. An einem Beispiel soll der Vorgang verdeutlicht werden:

Am TAC wird als Beobachtungszeit 50 ns eingestellt. Die interne Spannungsrampe beträgt im Maximum 8 V. Diese 8 V entsprechen der Gesamtzahl von 1024 Kanälen im Vielkanalzähler, d.h. die Kanalbreite beträgt 48,8 ps. Wird bei einem Experiment die Spannungsrampe nach 25 ns gestoppt, beträgt ihr Wert 4 V. Dies entspricht dem Kanal 512 im Vielkanalzähler, dessen Wert um 1 erhöht wird.

Nach vielfacher Wiederholung erhält man ein Histogramm über die Häufigkeit, das erste Fluoreszenzphoton in einem bestimmten Zeitabschnitt zu detektieren. Diese Häufigkeit ist direkt proportional zur Wahrscheinlichkeit, ein Fluoreszenzphoton zu registrieren. Damit gibt das Histogramm nach obiger Beziehung die gesuchte Abklingkurve wieder.

Da beim TAC-Verfahren nur immer das erste Fluoreszenzphoton registriert wird, würden hohe Emissionsintensitäten, d.h. das Auftreten von zwei oder mehr Fluoreszenzphotonen pro Laserschuss, zu einer Überbetonung kurzer Abklingzeiten führen (Pile-up-Effekt). Um dies zu vermeiden, wurde die Emissionsintensität durch Graufilter (Schott Neutralgläser) im Bedarfsfall soweit abgeschwächt, bis maximal ein Photon auf 50 Laserpulse registriert wurde.

4.4.2 Constant-Fraction-Discriminator

Für Spektroskopie im ps-Bereich finden Diskriminatoren mit fest vorgegebener Triggerschwelle (Leading-Edge-Diskriminatoren) keine Verwendung. Wie Abb. 4.7a zeigt, würde eine konstante Triggerschwelle bei unterschiedlich hohen Photomultiplierpulsen zu einer zeitlichen Ungenauigkeit führen, da der kleinere Puls später registriert wird. Dieser Zeitfehler liegt für Photomultiplier in der Größenordnung von 0.5 bis 1 ns.

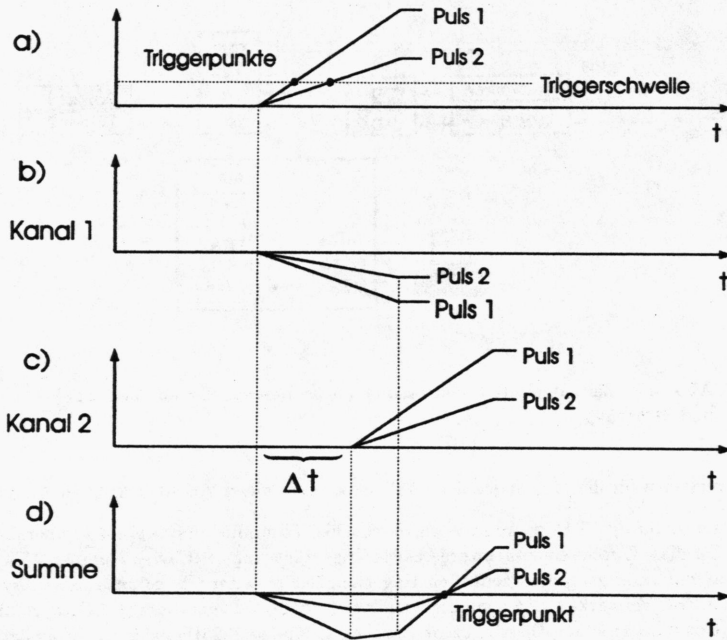


Abb. 4.7: Leading-Edge-Diskriminator (a) und Constant-Fraction-Verfahren (b-d)

Durch einen Constant-Fraction-Diskriminator kann dieser Fehler auf < 100 ps reduziert werden. Bei diesem Verfahren wird nicht auf eine absolute Höhe der ansteigenden Pulsflanke getriggert, sondern auf eine bestimmte relative Höhe. Die Abbildungen 4.7(b-d) verdeutlichen den Ablauf am Beispiel zweier Pulse.

Der ankommende Photomultiplierpuls wird in zwei Kanäle aufgeteilt. Im Kanal 1 (Abb. 4.7b) wird das Signal um einen festen Faktor abgeschwächt und invertiert, im Kanal 2 (Abb. 4.7c) um die Zeit Δt verzögert. Die Zeit Δt wird extern durch den Anschluß eines Verzögerungskabels vorgegeben. Sie richtet sich nach dem verwendeten Detektortyp. Die beiden Kanäle

werden addiert und der Nulldurchgang liefert den Triggerzeitpunkt (Abb. 4.7d). Für die Näherung eines linearen Anstiegs des betrachteten Signals ist dieser Nullpunkt unabhängig von der Amplitudenhöhe. Bei Photomultiplierpulsen ist diese Näherung vor allem im Bereich 10% bis 90% der maximalen Höhe gut erfüllt.

4.4.3 Meßaufbau

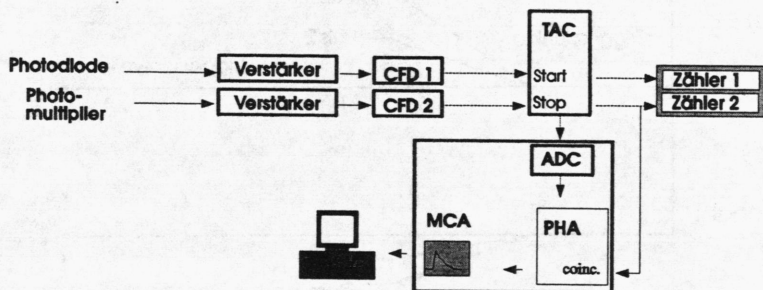


Abb. 4.8: Zeitaufgelöste Spektroskopie im ps-Bereich: Datenerfassung und Sicherung

Abb. 4.8 zeigt den für die Messungen der Abklingkurven in dieser Arbeit benutzten Aufbau.

Das Startsignal für den TAC wurde von einer schnellen Photodiode (s. Abb. 4.4) übernommen. Der für diese Zwecke eigentlich vorgesehene Triggerausgang des Cavity-Dumpers (TTL-Signal) war mit einer zu großen zeitlichen Ungenauigkeit behaftet ($\Delta t \approx 2\text{ ns}$). Das Signal wurde verstärkt (Verstärker: Eigenbau Elektronikwerkstatt Uni Regensburg, 1,2 GHz, 20 dB) und zum Constant-Fraction-Discriminator (Canberra, Modell 1326D) geleitet. In analoger Weise wurde mit dem Photomultiplier-Signal verfahren (Verstärker: Comlinear Corporation, CLC 100, 500 MHz, 20 dB; Constant-Fraction-Discriminator: Canberra, Modell 2128). Die Verzögerungszeit wurde auf ca. 1,2 ns eingestellt.

Der am Zeit-Amplituden-Konverter (Nuclear Enterprises Ltd., Modell NE4670) gewählte Konvertierungsbereich betrug 0 bis 50 ns, d.h. in dieser Zeit erreichte die Spannungsrampe ihren Maximalwert.

ADC, Pulshöhenanalysator und Vielkanalzähler waren in ein Gerät integriert (Northern Scientific Inc., Modell Econ II). Der ADC arbeitete mit einer Auflösung von 10 Bit. Der Meßbereich von 50 ns entsprach damit 1024 Kanälen bei einer Kanalbreite von jeweils 48,8 ps. Die gewünschte Meßzeit konnte direkt am Gerät eingestellt werden. Ein eingebauter Monitor erlaubte es, das entstehende Histogramm während der Messung zu beobachten. Mit einem Doppelzähler wurde zudem vor Beginn jeder Messung das Verhältnis der Start- und Stopimpulse überprüft, um Pile-up-Effekte zu vermeiden.

Ein von P. Obermeier (P. Obermeier, 1990) entwickeltes Meßprogramm speicherte das Histogramm nach Beendigung der Messung im Rechner ab.

4.4.4 Auswertung der Abklingkurven

Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 4.9 den mit der oben beschriebenen Apparatur detektierten Anregungspuls und eine typische Abklingkurve einer PS I-Probe. Beide Kurven wurden auf gleiche Höhe normiert.

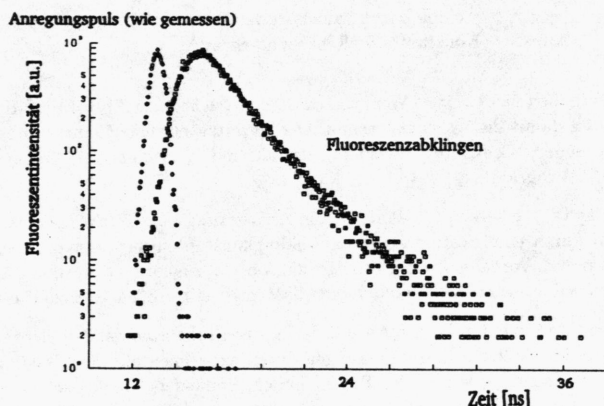


Abb. 4.9: Anregungspuls und Fluoreszenzabklingen einer PS I-Probe ($\lambda_{det} = 700 \text{ nm}$, $T = 115 \text{ K}$) im Vergleich

Die Auswertung der erhaltenen Abklingkurven erfolgte in der Regel durch die Berechnung von Abklingzeiten. Bei den Messungen an PS I wurde zusätzlich noch eine weitere Form der Auswertung herangezogen: die dreidimensionale Darstellung einer ganzen Abklingkurvenschar ($I(t, \lambda)$). Damit konnten zeitaufgelöste Spektren ermittelt werden.

Bei der Bestimmung der charakteristischen Abklingzeiten ist zu berücksichtigen, daß weder der Laserpuls noch die Geräteantwortfunktion im mathematischen Sinne eine Deltafunktion darstellen. Die Messkurve $m(t)$ ist damit die Faltung der Apparatefunktion $g(t)$ mit der tatsächlichen Fluoreszenzabklingfunktion $f(t)$ (P.A. Jansson, 1984):

$$m(t) = \int g(t - t') f(t') dt' \quad (4.9)$$

Nähere Aussagen über $f(t)$ lassen sich nur erhalten, wenn diesem Umstand im Auswerteprogramm (P. Obermeier, 1990) Rechnung getragen wird. Um den erheblichen Aufwand, den eine numerische Entfaltung der Meßkurve bedeutet, zu vermeiden, wurde die Faltung in der Fitfunktion berücksichtigt (reference convolution method). Als gut geeignete Fitfunktion

$b(t)$ erwies sich die Faltung einer Gaußfunktion als mit einer Summe aus mehreren Exponentialfunktionen, wobei die Gaußfunktion für die Geräteantwortfunktion steht.

$$b(t) = \int \exp(-\ln 2 (\frac{t-t'}{\Delta t})^2) \sum_{i=1}^n A_i \exp(-\frac{t'}{\tau_i}) dt' + \text{Konst.} \quad (4.10)$$

Δt : Halbwertsbreite der Gaußfunktion

n : Anzahl der Exponentialfunktionen

A_i : Amplituden der Exponentialfunktionen

τ_i : Abklingzeiten (auf $1/e$) der Exponentialfunktionen

Konst.: Konstante für Rauschuntergrund

Vorversuche ergaben für Δt einen Wert von ca. 350 ps (siehe auch Abb. 4.9). Mit dem Fitprogramm konnten damit die Amplituden und Abklingzeiten der einzelnen Fluoreszenzprozesse bestimmt werden. Die exakte Berechnung der A_i und τ_i erfolgte mit einem numerischen least-square-fit-Programm.

Wie bereits in Kap. 2 bereits erwähnt, ist die Auswertung von zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimenten durch eine Bestimmung von Abklingkonstanten nur sinnvoll, wenn diese eindeutig bestimmten Vorgängen im Untersuchungsobjekt zugeordnet werden können. Diese Zuordnung ist jedoch gerade bei biologischen Systemen mit großen Unsicherheiten behaftet:

a) Bei *in vivo* Experimenten ist die Anzahl der in der Probe ablaufenden Prozesse sehr groß (s. Abschnitte 2.2 bis 2.4). Einschränkungen durch experimentelle Randbedingungen (z.B. Temperaturerniedrigung), wie in der Physik üblich, können bei biologischen Systemen nur sehr begrenzt angewandt werden, da sie in den meisten Fällen zu nicht reproduzierbaren Veränderungen der Probe führen.

b) Die unter a) beschriebenen Schwierigkeiten lassen sich umgehen, wenn spezielle Präparationen benutzt werden, bei denen man die Zusammensetzung kennt (*in vitro* Experimente). Da beim Photosystem I nur auf indirektem Wege gewonnene Struktur- und Funktionsdaten vorliegen (s. Kap. 2.4), ist eine Zuordnung Abklingzeit – Prozeß im PS I immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Aus diesen Gründen wurden bei verschiedenen Experimenten auf der Grundlage der gemessenen Abklingkurven zeitaufgelöste Spektren ermittelt, um auch spektrale Informationen für die Auswertung heranziehen zu können.

Kapitel 5

Fluoreszenzspektroskopie an intakten Systemen

*Der Begriff 'intakte Systeme' soll darauf hinweisen, daß in diesem Kapitel die Ergebnisse von Experimenten vorgestellt werden, bei denen die Proben über einen vollständigen Photosyntheseapparat verfügten. Untersuchungsobjekte waren das Cyanobakterium *Anabaena variabilis*, die Grünalge *Chlorella vulgaris* und Spinatchloroplasten. Zielsetzung war dabei die Untersuchung des Anregungs- und Ladungstransfers in einem ungestörten, d.h. möglichst naturnahen System. Außerdem sollte geklärt werden, in welchem Umfang das PS I in intakten Systemen zur Gesamtfluoreszenz beiträgt.*

*Die Auswertung zeigte jedoch, daß eine vollständige Interpretation der Ergebnisse nur möglich ist, wenn die Unterschiede im Aufbau der Antennensysteme von Algen und Cyanobakterien in die Diskussion miteinbezogen werden. Daraus ergibt sich die Aufteilung dieses Kapitels in zwei große Abschnitte: in einem ersten Teil werden die Experimente an *A. variabilis* vorgestellt und interpretiert, während im zweiten Teil die an *C. vulgaris* und Chloroplasten gewonnenen Ergebnisse behandelt werden, da die Cyanobakterien einen im Antennenaufbau abweichenden Photosyntheseapparat besitzen.*

5.1 *Anabaena variabilis* (Cyanobakterien)

5.1.1 Fluoreszenzspektren

Untersuchungen im μs -Zeitbereich (siehe exp. Aufbau) ergaben, daß nach Anregung mit einem 200 ps Laserpuls über 90 % der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Zeitkanals der hierbei verwendeten Apparatur (100 ns) abklingt. In den der Anregung folgenden Zeitkanälen konnte nur ein sehr schwaches und statistisch gleichverteiltes Signal in der Größenordnung von 0 bis 5 counts/Kanal registriert werden. Es handelt sich dabei um ein Rauschsignal des Photomultipliers, das in der Auswertung nicht berücksichtigt wird.

Die folgenden Spektren geben daher das Fluoreszenzsignal im Zeitbereich 0 bis 100 ns nach der Anregung wieder. In den Bildunterschriften ist durch die Angabe ' $\Delta t = 100 \text{ ns}$ ' darauf hingewiesen. Die Spektren werden, soweit nichts anderes vermerkt ist, in ihren reellen Intensitätsverhältnissen abgebildet.

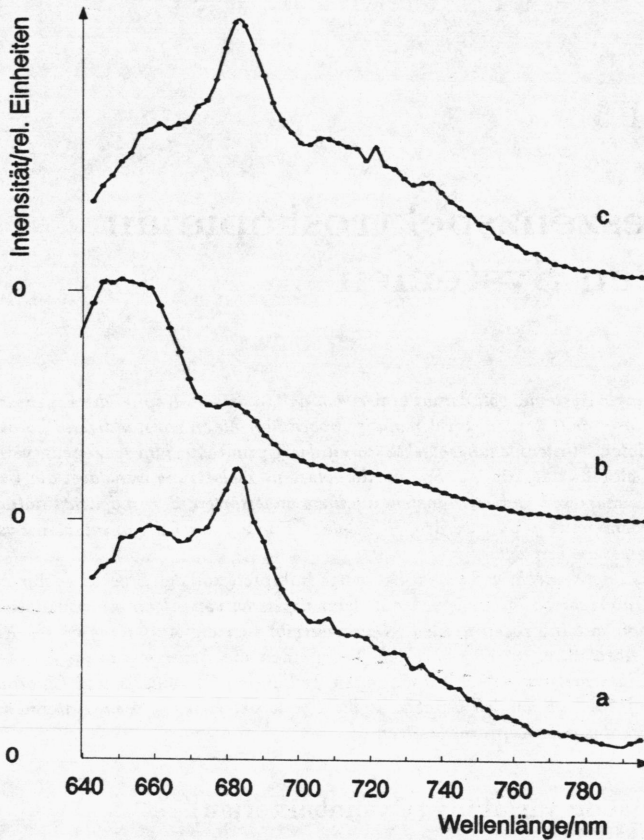


Abb. 5.1: Fluoreszenzspektrum von *A. variabilis* a) bei Raumtemperatur, b) bei 249 K, c) bei Raumtemperatur und Zugabe von DCMU; $\Delta t = 100$ ns (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

Bei Raumtemperatur weist das Fluoreszenzspektrum von *A. variabilis* (Abb. 5.1a) ein Hauptmaximum bei 683 nm und ein Nebenmaximum bei etwa 660 nm auf. Charakteristisch für die Anabaenaprobe ist außerdem der im Vergleich zu Chlorella- oder Chloroplastenproben (vgl. Kap. 5.2) sehr hohe Intensitätsanteil im Bereich 700 bis 760 nm.

Das Nebenmaximum bei ca. 660 nm konnte nur bei den Anabaenaprobe beobachtet werden, nicht jedoch bei Chlorella- und Chloroplastenproben. Für die Zuordnung dieser Emission läßt sich damit folgern, daß sie auf einen Bestandteil der Photosysteme zurückzuführen ist, der nur beim Cyanobakterium auftritt. Nach den in Kap. 3 beschriebenen Unterschieden der Proben

handelt es sich dabei um die Phycobilisomen, da diese charakteristisch für Cyanobakterien sind.

Durch Abkühlung auf 249 K verändern sich die relativen Intensitäten der beiden Maxima (s. Abb. 5.1b)). Die 660 nm Emission ist gegenüber der bei 683 nm verstärkt.

Ein gegenteiliger Effekt stellt sich bei Zugabe von DCMU ein (Abb. 5.1c)). Hier nimmt die Fluoreszenz bei 683 nm im Vergleich zur 660 nm-Emission noch zu.

Bei Organismen, die durch zwei in Reihe agierende Photosysteme charakterisiert sind, trägt überwiegend nur das PS II zur Fluoreszenz bei. Für den Anteil der prompten Fluoreszenz von PS I an der Gesamtemission werden in der Literatur Werte zwischen 10 und 6 % angegeben (siehe Kap. 2.4.2). Die eigenen Messungen an isolierten PS I-Reaktionszentren (s. Kap. 6) ergaben darüberhinaus eine zur PS II-Fluoreszenz analoge Intensitätsverteilung. Ein eventuell auftretender PS I-Anteil führt damit nur zu einer über alle Wellenlängen hinweg gleichmäßigen Erhöhung der Intensität. Bei der Größenordnung der hier diskutierten Effekte kann dieser Anteil daher vernachlässigt werden, d.h. die in den Abbildungen 5.1a)-c) dargestellten Emissionsverläufe müssen Vorgängen im PS II und seinen Antennen zugeordnet werden. Eine weitergehende Interpretation, insbesondere die 683 nm-Bande betreffend, ist jedoch nur aufgrund der Spektren nicht möglich, da im betrachteten Zeitfenster (100 ns) prinzipiell zwei Mechanismen zur Fluoreszenz im PS II beitragen können:

a) prompte Fluoreszenz aus Antennen

b) Rekombinationsfluoreszenz vom P 680 (verzögerte Fluoreszenz)

Prompte und verzögerte Fluoreszenz zeichnen sich durch unterschiedliches zeitliches Verhalten aus (siehe dazu Kap. 2.3). Eine genauere Aussage läßt sich daher über die Verbesserung der Zeitauflösung bei den Messungen erreichen. Aus diesem Grund wurden Abklingkurven mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = \pm 75$ ps bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

5.1.2 Abklingkurven im sub-ns-Zeitbereich

Die Abklingkurven wurden mit der in Abschnitt 4.4 vorgestellten Apparatur aufgenommen. Die Auswertung erfolgte, wie dort beschrieben, durch das Anpassen einer Referenzfunktion an die gemessenen Kurven (reference convolution method). Die Analyse der Messungen erbrachte hinsichtlich der Auswertungsmethodik folgende Ergebnisse:

– Das beobachtete Fluoreszenzabklingen ist nicht monoexponentiell, sondern mindestens biexponentiell.

– Die Verwendung von drei oder vier e-Funktionen für die Referenzkurve, ein Verfahren, das von anderen Arbeitsgruppen häufig angewandt wird (z.B. Hodges, M. und Moya, I., 1986, oder Haehnel, W., et al., 1983), führte zu keiner Verbesserung der Anpaßgenauigkeit.

Aus diesen Gründen erfolgte die Anpassung an die Meßkurven mit zwei e-Funktionen. Die endliche Breite des Anregungspulses wurde durch die Faltung der e-Funktionen mit einer Gaußfunktion berücksichtigt. Die Güte der Anpassung konnte mit dem χ^2 -Parameter und dem Residuenplot erfaßt werden. Die Werte der χ^2 -Parameters lagen bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Anpassungen bei < 1.2 . Zusätzlich wurde auf eine symmetrische Verteilung der Meßpunkte um die Referenzkurve herum geachtet. Das numerische 'least square-fit'-Verfahren wurde abgebrochen, wenn sich bei zwei aufeinanderfolgenden Anpassungsschritten der Wert des χ^2 -Parameters um weniger als 1 % veränderte. Abb. 5.2 zeigt repräsentativ eine Abklingkurve bei $\lambda_{em} = 668$ nm mit der angepaßten Referenzfunktion.

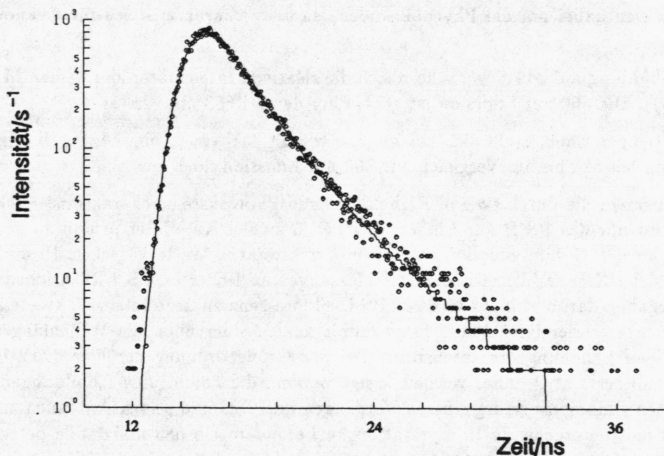


Abb. 5.2: Fluoreszenzabklingen von *A. variabilis* mit DCMU bei Raumtemperatur, $\lambda_{em} = 668$ nm

Die erste e-Funktion beschreibt den schnellen Abfall der Fluoreszenz unmittelbar nach dem Maximum, während die zweite an den Bereich niedriger Intensität angepaßt wurde. Bei allen Proben konnte zudem, wie bereits im letzten Abschnitt beschrieben, eine langanhaltende Emission beobachtet werden (Zeitbereich $t > 20$ ns). Ihre Intensität lag deutlich über der Nullrate, war aber trotzdem so gering ($I \sim 2\text{--}5$ s $^{-1}$), daß eine explizite Anpassung nicht möglich war.

Die zwei e-Funktionen werden durch ihre jeweiligen Abklingzeiten (τ_1 und τ_2) und ihre relativen Amplituden (A_1 und A_2) charakterisiert. Die beiden Abklingzeiten konnten mit folgender Genauigkeit bestimmt werden: $\Delta\tau_1 = \pm 75$ ps; $\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns.

Die weitere Diskussion stützt sich vornehmlich auf die Veränderungen der Abklingzeiten. Aufgrund von Schwankungen der Laserintensität, die sich auch durch genaue Justierung der entsprechenden Spiegel nicht beseitigen ließen, sind die Absolutwerte der Amplituden in der Regel nicht vergleichbar. Für die Auswertung werden daher, soweit notwendig, nur die Intensitätsverhältnisse (z.B. A_2/A_1) herangezogen.

Abb. 5.3 zeigt τ_1 bei 295 K. Sie liegt bei Proben ohne weitere Zusätze für alle gemessenen Wellenlängen bei ca. 700 ps. Die Zugabe von Natriumdithionit (Reduktionsmittel) verändert diese Zeit nicht. Erst DCMU bewirkt eine Verlängerung auf Werte von 1.4 ns (bei 650 nm), bzw. 1.0 bis 1.1 ns bei den übrigen Wellenlängen.

Bei 258 K ergibt sich ein von der Tendenz her ähnliches Verhalten (Abb. 5.4). Die Probe ohne Zusätze und die Natriumdithionit-Probe zeigen keinen Unterschied in der Abklingzeit. Die Werte variieren zwischen 1.1 und 1.3 ns. Um etwa 300 ps darüber liegen die Werte der Probe mit DCMU.

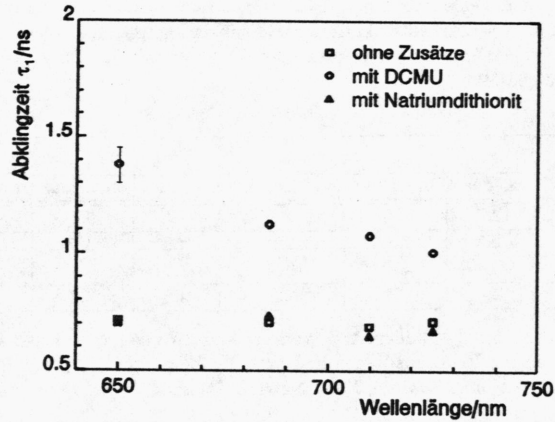


Abb. 5.3: Abklingzeit τ_1 von *A. variabilis* bei verschiedenen Wellenlängen und Redoxzuständen, $T = 295\text{ K}$ ($\Delta\tau_1 = \pm 75\text{ ps}$)

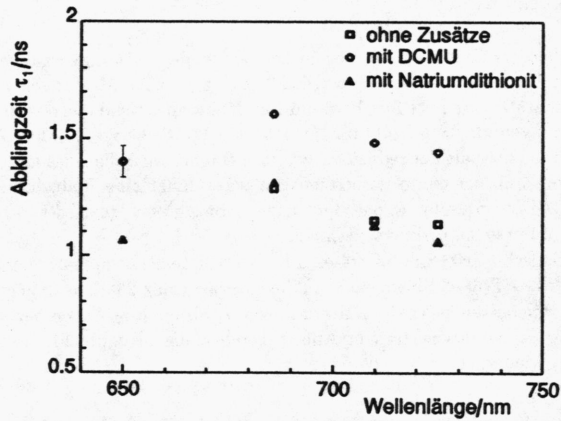


Abb. 5.4: Abklingzeit τ_1 von *A. variabilis* bei verschiedenen Wellenlängen und Redoxzuständen, $T = 258\text{ K}$ ($\Delta\tau_1 = \pm 75\text{ ps}$)

Die Werte von τ_2 sind wegen der großen Streuung der Abklingkurven in diesem Zeitbereich (s. Abb. 5.2) mit einem Fehler von $\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns behaftet. Da im Rahmen der Fehlergenauigkeit bei keiner der in dieser Arbeit diskutierten Messungen signifikante Veränderungen von τ_2 mit der Wellenlänge erkennbar sind, werden die Werte nur tabellarisch angegeben. Sie sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

λ/nm	τ_2/ns (T = 295 K)			τ_2/ns (T = 258 K)		
	o. Zus.	mit NaD	mit DCMU	o. Zus.	mit NaD	mit DCMU
650	2.7	3.0	3.3	–	3.4	3.9
686	2.7	4.6	2.9	2.9	3.6	3.9
710	2.4	3.2	2.9	2.7	3.6	3.9
725	2.6	3.7	2.9	2.8	3.2	3.5

Tabelle 5.1: Abklingzeit τ_2 von *A. variabilis* bei verschiedenen Wellenlängen, Redoxzuständen und zwei Temperaturen ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns)
(o. Zus.: ohne Zusätze; NaD: Natriumdithionit)

Die Werte von τ_2 weisen eine sehr große Streuung auf. Eine direkte Korrelation mit den Versuchsbedingungen (Temperatur, Redoxzustand) ist dabei nicht zu erkennen. Im Mittel liegt τ_2 zwischen 3 und 4 ns.

5.1.3 Diskussion

Wie bereits oben erwähnt sind die hier zu beobachtenden Abklingvorgänge auf Prozesse im PS II zurückzuführen. Zur Kontrolle wurden jedoch zusätzlich Messungen vorgenommen, bei denen der primäre Donor im PS I, P 700, durch Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert wurde. Die Untersuchungen an PS I-Reaktionszentren (s. Kap. 6) belegen, daß P 700⁺ die Fluoreszenz effizienter quencht als der reduzierte primäre Donor. Im Falle eines signifikanten Anteiles von PS I-Fluoreszenz an der Gesamtintensität wäre daher eine Reduzierung der Intensität zu erwarten. Diese konnte im Experiment nicht beobachtet werden, d.h. Einflüsse vom PS I sind für diese Untersuchungen auszuschließen.

Die charakteristische Zeit für die erste, d.h. schnellste Rekombinationsreaktion im PS II (P 680⁺ Phaeo⁻ → P 680* Phaeo) wird in der Literatur mit 25-40 ns angegeben (G. Renger, 1992). Die hier gemessenen Abklingzeiten, sowohl τ_1 als auch τ_2 , liegen deutlich unter diesem Wert, d.h. die Emissionsspektren in Abb. 5.1 geben die prompte Fluoreszenz nach einem Anregungspuls wieder.

Die Abklingzeit τ_1 bei unbeeinflusster Probe beträgt im Mittel ca. 700 ps (Abb. 5.3). Sie liegt damit in derselben Größenordnung wie der von W. Leibl et al. (1989) an Membranfragmenten ermittelte Wert von 150-200 ps für den Anregungseinfang. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Antennengrößen in den beiden Untersuchungen (hier: ca. 500 Chl a/P 680; W. Leibl et al.: 80-100 Chl a/P680), so ergibt sich bei den Proben ohne Zusätze folgende Zuordnung: der hier ermittelte Wert von τ_1 ist bei aufnahmebereiten (offenen) PS II-Zentren die charakteristische Zeit für den Transfer einer Anregung innerhalb der Antenne bis zum Einfang an P 680.

Der Wert steht in sehr guter Übereinstimmung mit Messungen von D. Foguel et al. (1992), die für die Fluoreszenzlebensdauer der mittleren Abklingkomponente bei *A. variabilis* eine lorentzförmige Verteilung der charakteristischen Zeiten mit einem Maximum bei 703 ns fanden. D. Foguel et al. interpretierten diese Lebensdauer ebenfalls als charakteristische Zeit für die Anregungsweiterleitung. Um sicherzustellen, daß der für τ_1 ermittelte Wert nicht durch den Einfluß 'geschlossener' Photosynthesezentren (d.h. Zentren im oxidierten Zustand, $P\ 680^+$) verlängert ist, wurde zur Kontrolle eine Probe mit Ascorbinsäure, einem Reduktionsmittel, versetzt. Durch die Zugabe von Ascorbinsäure ist sichergestellt, daß vor jedem Laserblitz alle Photosynthesezentren im 'offenen Zustand' vorliegen (d.h. $P\ 680$). Einflüsse von 'geschlossenen' Zentren ($P\ 680^+$), wie z.B. Transfer der Anregung zu benachbarten 'offenen' Zentren (lake-model, siehe Kap. 2.2), können dadurch ausgeschaltet werden. Auch bei diesen Messungen ergab sich keine Veränderung von τ_1 , d.h. die Zeitdauer für den Transfer einer Anregung in den Antennen von PS II bis zum Einfangen am primären Donor beträgt ca. 700 ps.

Bei den Proben mit DCMU liegt eine andere Ausgangssituation vor. In Kap. 2.3 wurde bereits beschrieben, daß DCMU den Ladungstransfer von Q_A nach Q_B unterbricht. Bei Belichtung und nachfolgender Ladungstrennung am $P\ 680$ kann das Elektron nur bis Q_A wandern. Es bleibt dort über mehrere Sekunden stabil eingefangen, da die Reduktion von $P\ 680^+$ durch den wasserspaltenden Komplex eine Rekombination der Ladungen verhindert. Im dunkeladaptierten Zustand, d.h. der wasserspaltende Komplex befindet sich im S_0/S_1 -Zustand, erfolgt diese Reduktion innerhalb von 23 ns (H.T. Witt et al., 1986), während die Rekombination von Q_A^- her bei Raumtemperatur einige μs erfordern würde. Bei dem hier durchgeführten Fluoreszenzexperiment betrugen die Wiederholrate des Laser 41 kHz und die Dauer für die Messung einer Abklingkurve im Mittel 50 min. Damit stellt sich trotz der geringen Anregungsintensität nach einer 'Einschwingphase' von einigen Sekunden $P\ 680$ Phaeo Q_A^- als Ausgangszustand für das Experiment ein. F.J.E. van Mieghem et al. (1989) registrierten in ESR-Messungen ein Ausbleiben des Rekombinations-Triplettsignales vom primären Donor, wenn Q_A in reduzierter Form vorliegt. Sie schließen daraus, daß die elektrostatische Abstoßung des Elektrons an Q_A die Ausbildung des Zustandes $P\ 680^+$ Phaeo Q_A^- behindert, d.h. eine Ladungstrennung wird unterbunden.

Im Fluoreszenzexperiment müßte sich dies durch eine Verlängerung der Abklingzeit bemerkbar machen, da die Ladungstrennung als photochemischer Quenchingprozeß wegfällt. Wie Abb. 5.3 zeigt, führt die Zugabe von DCMU zu einer Verlängerung von τ_1 . Die Fluoreszenz wird in diesem Fall nur mehr durch 'interne' Vorgänge (z.B. Wechselwirkungen der Chl-Moleküle etc.) begrenzt. Die hier vorgenommenen Untersuchungen unterstützen damit die Theorie, daß eine Reduktion von Q_A die Ladungstrennung am primären Donor verhindert.

Im Fluoreszenzspektrum äußert sich diese Verhinderung der Ladungstrennung in einem Anstieg der Emission bei 683 nm und im Bereich 690 bis 740 nm (Abb. 5.1c) gegenüber der Probe ohne Zusätze. Der Anstieg ist auf die verstärkt einsetzende prompte Fluoreszenz aus der Kernantenne und von $P\ 680^+$ zurückzuführen.

Die Fluoreszenz aus den Phycobilisomen ($\lambda_{em} \approx 650$ nm) nimmt nicht im gleichen Ausmaß zu. Dies ist erklärbar durch die ihnen eigene 'funnel'-Struktur (R. van Grondelle, 1985, siehe auch Kap. 2.2.2). Sie bewirkt eine schnelle Ableitung der Anregungsenergie hin zur zentralen Antenne, in der es aufgrund des fehlenden photochemischen Quenchens zu einem Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu Proben ohne DCMU kommt. Das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich dabei jedoch nicht. Für die interne Struktur der zentralen Antenne muß daher

eine 'random lattice'-Anordnung der Pigmente angenommen werden.

Die Reduktion von Q_A kann normalerweise auch über die Zugabe von Natriumdithionit erreicht werden. Das Redoxpotential von Natriumdithionit ist stark pH-abhängig. Bei pH 10.5 wird ein Wert von -540 mV erreicht. Dieses Potential verändert sich bei sinkendem pH-Wert mit ca. 120 mV/pH-Einheit in Richtung positiver Redoxpotentiale. Bei den in der Zelle herrschenden pH-Werten kann aber Q_B trotzdem reduziert werden ($E_m \approx -50$ mV; L. Stryer, 1988). Damit wird ein zur Blockierung mit DCMU analoger Zustand erreicht. Wie Abb. 5.3 zu entnehmen ist, ergibt sich hier jedoch keine Veränderung von τ_1 gegenüber den Proben ohne Zusatz. Daraus muß geschlossen werden, daß das Reduktionsmittel nicht durch die Zellwand hindurch diffundieren konnte. Daher wurde dieser Versuch an Chloroplasten wiederholt (s. Kap. 5.2.3).

Die Veränderung von τ_1 bei den Messungen im Temperaturbereich um 253 K deutet auf eine Störung des Anregungstransfers zwischen den einzelnen Komponenten des Antennensystems hin. Untersuchungen der Membranbeweglichkeit mit Fluoreszenzmarkern ergaben, daß bei Unterschreiten eines Temperaturoptimums eine 'laterale Phasentrennung' in der Membran auftritt (W.B. Terzaghi et al., 1989). Bei der lateralen Phasentrennung beginnen die Membranlipide zu 'gefrieren' und bilden kleine Domänen aus. Die Beweglichkeit der Membran insgesamt wird eingeschränkt. Die Temperaturoptima lagen für die von Terzaghi et al. beschriebenen Pflanzen bei ca. 288 K. Einen ähnlichen Wert konnte U. Klotzbücher (1991) für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ermitteln.

Da die Phycobilisomen als scheibchenförmige Stapel auf der Außenseite der Thylakoidmembran sitzen und nicht in diese eingebettet sind, bewirkt die im Experiment durchgeführte Temperaturniedrigung eine beginnende Ablösung oder zumindest eine schlechtere Ankopplung der Phycobilisomen an die Kernantenne. Dieser Effekt wird in seiner Tendenz durch Untersuchungen von D. Foguel et al. (1992) bestätigt, die eine Ablösung und vollständige Dissoziation der Phycobilisomen durch Abkühlen auf 253 K und einem Druck von 2.4 kbar induzieren konnten.

Bei einer verminderten Ankopplung an die Kernantenne wird die Anregungsenergie verstärkt als Fluoreszenz abgegeben. Im Fluoreszenzspektrum äußert sich dies in einer Erhöhung des Maximums bei 650 nm (Abb. 5.1b). Außerdem führt der gestörte Anregungstransfer zu einer Verlängerung der Abklingzeit τ_1 (Abb. 5.4).

Die Abklingzeit τ_2 beträgt bei den hier untersuchten Proben zwischen 3 und 4 ns (Tab. 5.1), wobei die relative Amplitude bei 4 - 8 % liegt, verglichen mit der ersten Abklingkomponente. Die große Schwankungsbreite von τ_2 ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns) ist bedingt durch das starke Rauschen im letzten Teil der Abklingkurve. In Übereinstimmung mit Literaturdaten kann τ_2 dem Fluoreszenzabklingen von Antennenkomplexen zugeordnet werden, die keine Anbindung an Reaktionszentren besitzen (G.H. Schatz, A.R. Holzwarth, 1986).

Bei den Proben mit DCMU wird die Ladungstrennung verhindert. Es zeigt sich aber weder in der relativen Amplitude A_2 , noch in der Abklingzeit τ_2 ein Unterschied zu den anderen Proben. Die von V.V. Klimov (1984) vertretene Theorie, daß es sich bei der langlebigen Emission um verzögerte Fluoreszenz handelt, kann durch diese Untersuchung nicht bestätigt werden.

Zusammengefaßt können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- *In vivo* beträgt die Zeitdauer für den Einfang eines Photons, den Transfer der Anregung zum primären Donor und die Ladungstrennung ca. 700 ps (τ_1).
- Ein Fluoreszenzbeitrag von Photosystem I konnte nicht ermittelt werden.
- Die Fluoreszenzexperimente bestätigen, daß eine Reduktion von Q_A die Ladungstrennung am primären Donor verhindert.
- Bei Abkühlung auf 253 K kommt es zu Veränderungen in der Thylakoidmembran, die den Anregungstransfer behindern. Die Ankopplung der Phycobilisomen an den Kernbereich des Photosystems II ist nicht mehr gewährleistet. Die Abklingzeit τ_1 vergrößert sich dadurch.
- Die lange Abklingzeit ($\tau_2 \approx 3.5$ ns) ist nicht auf Rekombinationsfluoreszenz zurückzuführen, sondern entspricht ebenfalls, wie τ_1 , prompter Fluoreszenz.

5.2 Chlorella vulgaris und Chloroplasten

5.2.1 Fluoreszenzspektren

Chlorella vulgaris

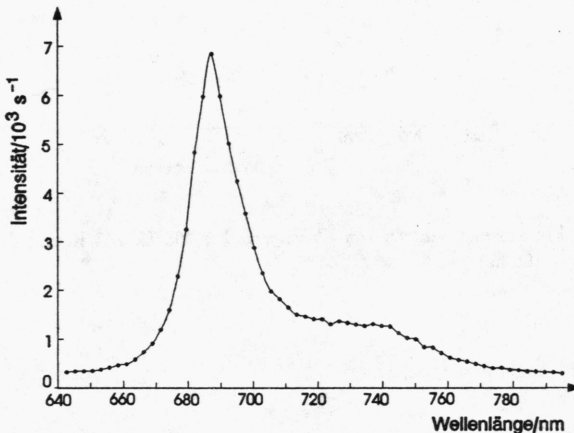


Abb. 5.5: Fluoreszenzspektrum von *C. vulgaris* bei 295 K, $\Delta t = 100$ ns

Im Unterschied zu den bei *A. variabilis* gewonnenen Fluoreszenzspektren weist das von *C. vulgaris* nur ein Maximum bei 688 nm auf (Abb. 5.5). Das hier abgebildete Spektrum gibt die in einem Zeitraum von 100 ns nach der Anregung abgegebene Fluoreszenz bei 295 K wieder. Charakteristisch sind dabei der steile Anstieg der Emission ab ca. 660 nm, sowie auf der langwelligen Seite des Maximums ein Plateaubereich, der sich bis ca. 740 nm erstreckt.

Analog zu den Ergebnissen bei *A. variabilis* konnte auch hier beobachtet werden, daß über 90 % der Fluoreszenzintensität im Zeitraum von 100 ns nach der Anregung emittiert wird. In den übrigen Zeitkanälen des 64-Kanal-Zählers (s. Kap. 4.3) wurde nur ein spektral gleichmäßig verteiltes Signal registriert, dessen Intensität pro Kanal bei ca. 0.1 % des Maximalwertes lag.

Eine Variation der Temperatur ergab keine spektralen Veränderungen. Die Messungen wurden im Temperaturbereich von 295 K bis 178 K durchgeführt. Abb. 5.6 zeigt exemplarisch zwei Spektren bei 255 K und 178 K. Zum Vergleich ist das Raumtemperaturspektrum mit abgebildet.

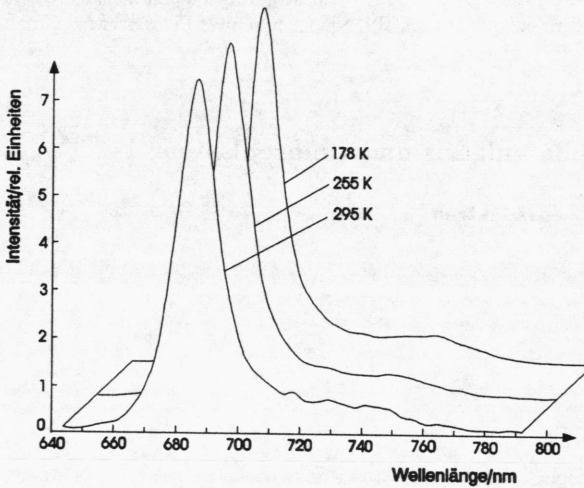


Abb. 5.6: Fluoreszenzspektren von *C. vulgaris* bei 295 K, 255 K und 178 K ($\Delta t = 100$ ns)

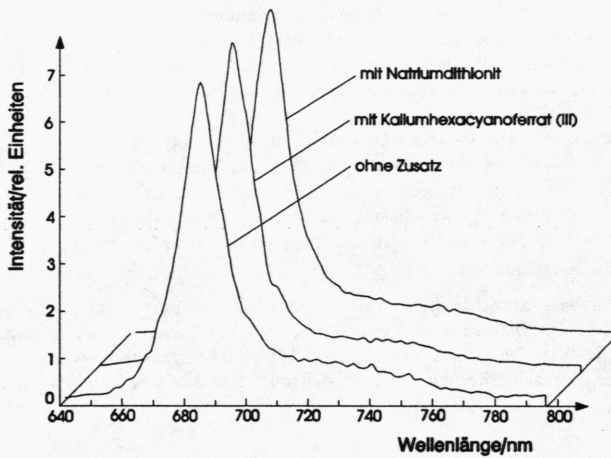


Abb. 5.7: Fluoreszenzspektren von *C. vulgaris* unbehandelt, mit Natriumdlithionit und mit Kaliumhexacyanoferrat(III) bei 295 K ($\Delta t = 100$ ns)

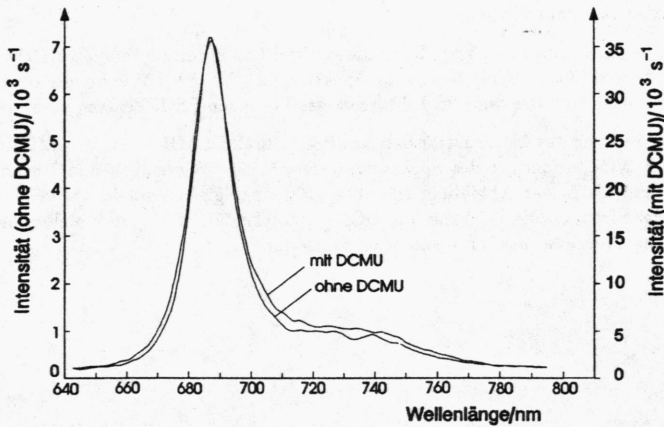


Abb. 5.8: Fluoreszenzspektren von *C. vulgaris* mit und ohne DCMU, $T = 295$ K ($\Delta t = 100$ ns)

Die Zugabe von Natriumdithionit oder Kaliumhexacyanoferrat(III) führte ebenfalls zu keiner Veränderung des Spektrums, weder in der Intensität noch in der Form (Abb. 5.7). Natriumdithionit ist ein starkes Reduktionsmittel und beschleunigt die Rückreduktion des primären Donors nach einer Ladungstrennung, d.h. ein möglicher Einfluß von geschlossenen Photosystemen ($P\ 680^+$) wird verhindert.

Kaliumhexacyanoferrat(III) wirkt als Oxidationsmittel nur auf PS I. Eine eventuell auftretende Rekombinationsfluoreszenz von PS I kann daher ausgeschlossen werden. Außerdem wird zusätzlich die prompte Fluoreszenz von PS I geschwächt, da der oxidierte primäre Donor, $P\ 700^+$, die Fluoreszenz sehr effizient unterdrückt (siehe Kap. 6).

Damit ist sichergestellt, daß die hier gemessene Emission nur auf Vorgänge im PS II zurückzuführen ist.

Ein anderes Ergebnis erbrachte die Blockierung des Ladungstransfers mit DCMU. Während sich an der Form des Spektrums nichts änderte, stieg die Gesamtintensität etwa um einen Faktor 5-6 an. In Abb. 5.8 ist dies durch unterschiedliche Achsenskalierungen wiedergegeben. Die rechte Intensitätsachse bezieht sich auf die Probe ohne Zusätze, die linke auf die DCMU-Probe.

Chloroplasten

Das zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrum von Spinatchloroplasten weist dieselben Charakteristika auf wie das von *C. vulgaris* (Abb. 5.9). Einem steilen Anstieg der Intensität ab 660 nm folgt ein einzelnes Maximum bei 684 nm. Im langwelligen Bereich (700 bis 750 nm) ist ein Plateau zu erkennen, nach dem die Intensität auf den Ausgangswert absinkt. Die Proben-temperatur von 273 K wurde gewählt, weil Chloroplasten bei dieser Temperatur über einige Stunden hinweg intakt bleiben.

Die Zugabe von Oxidations- bzw. Reduktionsmittel (Kaliumhexacyanoferrat(III), Natriumdithionit) bewirkt keine Veränderung der Spektren (s. Abb. 5.9). Wie bereits oben erläutert werden dadurch Einflüsse vom PS I bzw. von geschlossenen PS II-Zentren verhindert.

Die Unterbrechung des Ladungstransfers am PS II durch DCMU erbrachte an Chloroplasten bei pH 7.8 keine Änderung des Spektrums (Abb. 5.10). Wie eingehende Untersuchungen ergaben, sind die in der Abbildung erkennbaren geringfügigen Abweichungen der Spektren voneinander nicht auf die Wirkung von DCMU zurückzuführen, sondern stellen die normale Schwankungsbreite der hier untersuchten Proben dar.

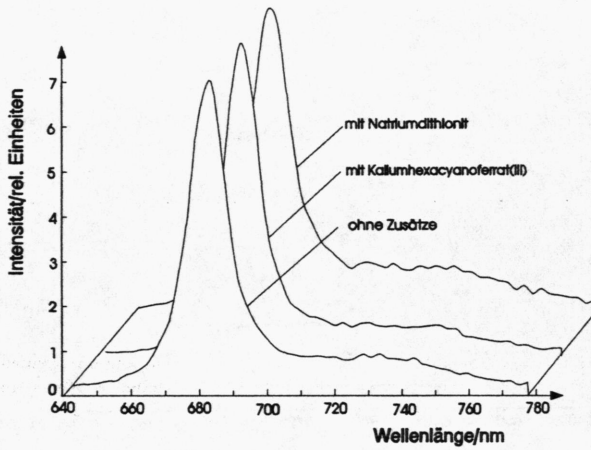


Abb. 5.9: Fluoreszenzspektren von Spinachchloroplasten ohne Zusätze, mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und mit Natriumdithionit bei 273 K und pH 7.8 ($\Delta t = 100$ ns)

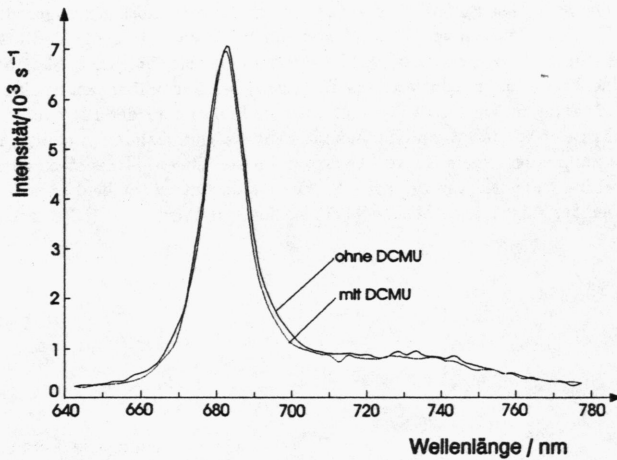


Abb. 5.10: Fluoreszenzspektren von Spinachchloroplasten mit und ohne DCMU bei 273 K und pH 7.8 ($\Delta t = 100$ ns)

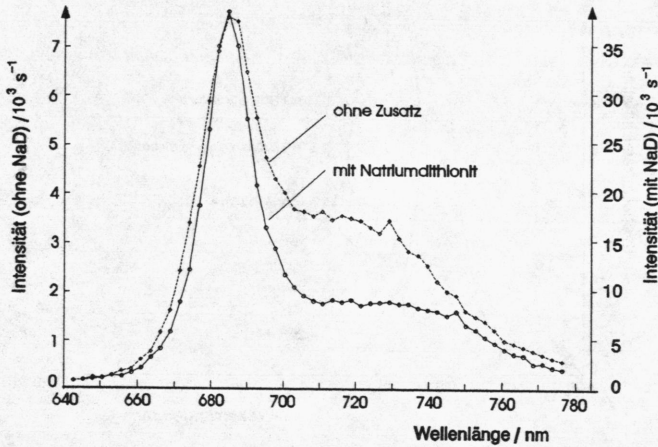


Abb. 5.11: Fluoreszenzspektren von Spinachchloroplasten mit und ohne Natriumdithionit bei 273 K und pH 10.5 ($\Delta t = 100$ ns)

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man die Chloroplastenpräparation in Glycinpuffer (pH 10.5), statt in der normalen Pufferlösung aufnimmt. In diesem Fall kann wegen des Fehlens der äußeren Zellhülle im Inneren der Chloroplasten mit Hilfe von Natriumdithionit ein höheres Redoxpotential eingestellt werden. Abb. 5.11 zeigt das Ergebnis für eine Probe ohne weitere Zusätze und eine Probe unter reduzierenden Bedingungen. Gegenüber den Spektren bei pH 7.8 ist hier das Maximum bei der Probe ohne Zusätze breiter und der Plateaubereich (700-740 nm) erreicht ca. 50 % der Maximalintensität. Mit Natriumdithionit findet man eine im Bereich des Maximums schmalere Kurve. Auch vom Intensitätsverhältnis Maximum/Plateau her ähnelt sie stärker den Kurven bei pH 7.8. Die Gesamtintensität liegt jedoch um einen Faktor 5 - 6 über derjenigen ohne Zusätze (bei gleichem pH-Wert).

5.2.2 Abklingkurven im sub-ns-Zeitbereich

Für die Messung und Anpassung der Abklingkurven gilt das in den Abschnitten 4.4.4 und 5.1.2 gesagte weiter. Die wichtigsten Punkte seien hier kurz wiederholt:

- Die Meßkurven geben das Fluoreszenzabklingen im Zeitbereich von 0 bis ca. 40 ns nach der Anregung wieder.
- Ein Vorlauf von etwa 10 ns vor dem Anregungspuls wurde zur Bestimmung der Dunkelrate mitregistriert.
- Die Anpassung der Kurven erfolgte mit der Faltung einer Gaußfunktion mit zwei abfallenden Exponentialfunktionen.
- Für die weitere Auswertung werden die charakteristischen Zeiten der e-Funktionen, τ_1 und τ_2 , herangezogen.
- Der Fehler bei der Bestimmung von τ_1 beträgt ± 75 ps, für τ_2 ergibt sich ± 0.5 ns.

Chlorella vulgaris

Bei den Proben ohne Zusätze liegt τ_1 zwischen 500 und 800 ps (Abb. 5.12). Durch DCMU verlängert sich dieser Wert auf 1.5 bis 2.0 ns.

Die Absenkung der Temperatur auf 253 K führt zu einer starken Veränderung: die Verlängerung durch DCMU wird aufgehoben, in beiden Fällen ergibt sich eine im Rahmen der Meßgenauigkeit identische Abklingzeit von ca. 700 bis 800 ps (Abb. 5.13).

Eine Reduktion der Proben mit Natriumdithionit führte bei keiner der beiden Temperaturen zu einer signifikanten Veränderung von τ_1 gegenüber den Werten ohne Zusatz. Daher wurden die Ergebnisse dieser Versuchsreihen nicht in die Abbildungen aufgenommen.

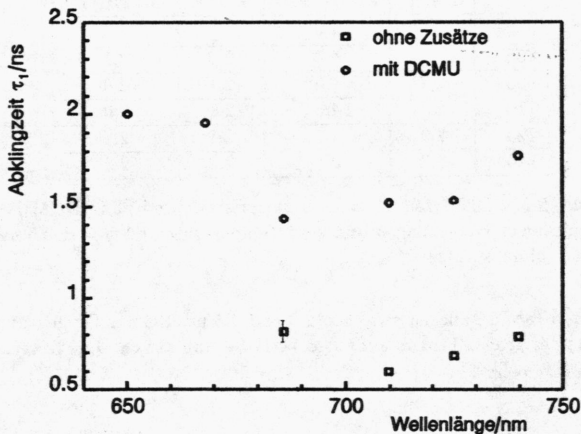


Abb. 5.12: Abklingzeit τ_1 von *C. vulgaris* bei verschiedenen Wellenlängen, mit und ohne DCMU, $T = 295$ K

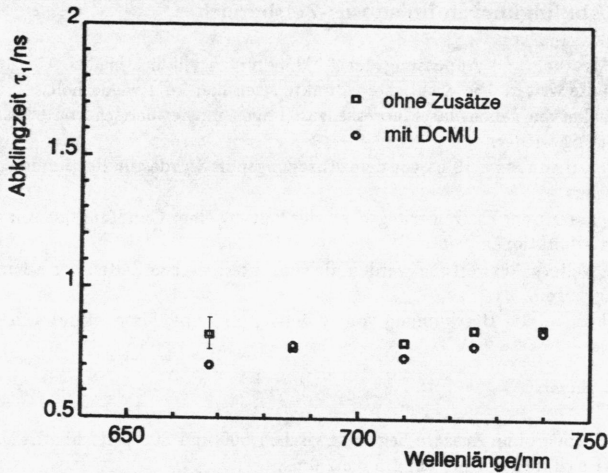


Abb. 5.13: Abklingzeit τ_1 von *C. vulgaris* bei verschiedenen Wellenlängen, mit und ohne DCMU, $T = 253$ K

λ/nm	τ_2/ns ($T = 295$ K)		τ_2/ns ($T = 253$ K)	
	o. Zus.	mit DCMU	o. Zus.	mit DCMU
650	—	4.4	—	—
668	—	4.4	2.0	2.1
686	2.2	4.8	2.1	2.0
710	2.3	4.5	2.1	2.0
725	2.3	4.1	2.1	2.1
740	2.3	3.8	2.2	2.2

Tabelle 5.2: Abklingzeit τ_2 von *C. vulgaris* mit und ohne DCMU bei verschiedenen Wellenlängen und zwei Temperaturen ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns)
o. Zus.: ohne Zusätze

Die Werte von τ_2 (Tab. 5.2) liegen zwischen 2.0 und 2.5 ns. Bei der Probe mit DCMU kann jedoch eine trotz des großen Fehlers auffällige Verlängerung auf ca. 4 ns festgestellt werden.

Chloroplasten

Für die verschiedenen Messungen an Chloroplastenproben bei pH 7.8 sind in Abb. 5.14 exemplarisch die Ergebnisse ohne Zusätze und mit DCMU dargestellt. Die Abklingzeit τ_1 liegt für beide Proben zwischen 1.4 und 1.5 ns mit einer nur sehr kleinen und unsystematischen Schwankung.

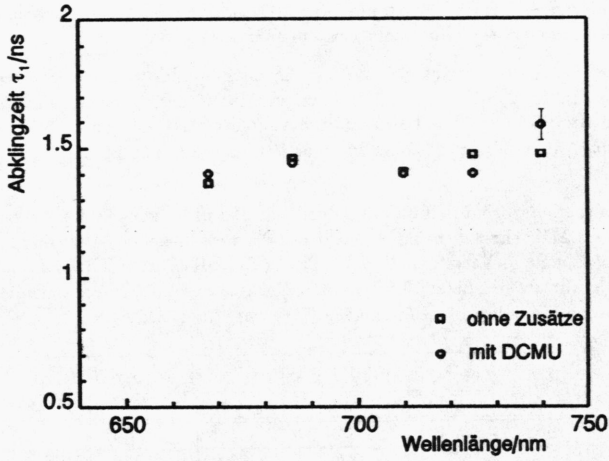


Abb. 5.14: Abklingzeit τ_1 von Spinachchloroplasten bei verschiedenen Wellenlängen, mit und ohne DCMU, $T = 273\text{ K}$, $\text{pH } 7.8$

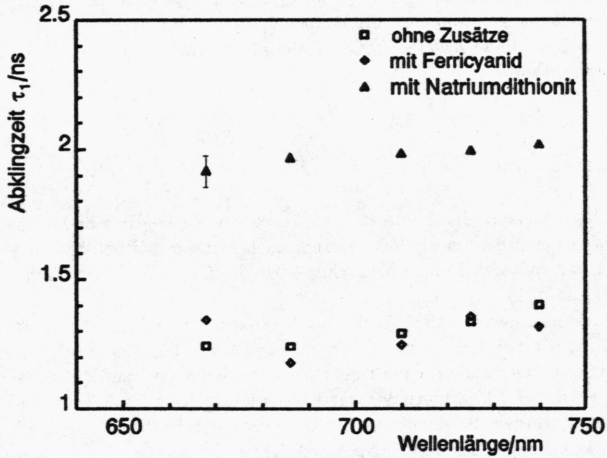


Abb. 5.15: Abklingzeit τ_1 von Spinachchloroplasten bei verschiedenen Wellenlängen und Redoxzuständen, $T = 273\text{ K}$, $\text{pH } 10.5$

Die Veränderungen des Redoxzustandes durch Oxidations- bzw. Reduktionsmittel erbrachten keine Abweichungen gegenüber den hier angeführten Werten.

Ein anderes Verhalten ergibt sich bei den in Glycinpuffer aufgenommenen Präparationen (pH 10.5). In Abb. 5.15 ist das Verhalten von τ_1 wiedergegeben. Ohne Zusätze und bei Oxidation von PS I (Probe mit Kaliumhexacyanoferrat(III)) liegen die Werte um 1.3 ns. Die Zugabe von Natriumdithionit führt zu einer Verlängerung auf 2.0 ns.

Die Abklingzeiten τ_2 sind in Tab. 5.3 aufgelistet. Bei pH 7.8 liegen die Werte der Proben mit und ohne DCMU sehr nah beieinander. Über die verschiedenen Wellenlängen hinweg ergibt sich nur eine geringe Variation. Die Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer Verlängerung von τ_2 . Die Mittelwerte für die Proben ohne Zusätze und mit Oxidationsmittel liegen bei ca. 4 ns, während die reduzierte Probe einen Wert von 7.3 ns aufweist.

λ/nm	τ_2/ns (pH 7.8)		τ_2/ns (pH 10.5)		
	o. Zus.	mit DCMU	o. Zus.	mit FeCy	mit NaD
668	3.4	3.2	4.9	4.1	7.3
686	3.4	2.9	3.9	4.1	7.3
710	3.4	3.2	3.9	3.9	7.3
725	3.4	3.2	3.9	3.9	7.3
740	3.4	3.2	3.9	4.4	7.3

Tabelle 5.3: Abklingzeit τ_2 von Spinatchloroplasten bei verschiedenen Wellenlängen und zwei pH-Werten ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns)

o. Zus.: ohne Zusätze; FeCy: Kaliumhexacyanoferrat(III); NaD: Natriumdithionit

5.2.3 Diskussion

Gemeinsames Merkmal der Fluoreszenzspektren von *C. vulgaris* und Chloroplasten ist der steile Anstieg der Emission ab 660 nm und ein Maximum bei 686 bzw. 684 nm. Vor allem das Fehlen von weiteren Emissionsmaxima steht im Gegensatz zum Verhalten der Anabaenapollen (Abb. 5.1).

Rekombinationsfluoreszenz als Ursache des Maximums bei 684 nm scheidet aus den gleichen Gründen aus, wie bei den Spektren von *A. variabilis*. Die hier bestimmten Abklingzeiten sind deutlich kürzer als die für die Rückreaktion von Phaeo^- auf P 680^+ ermittelten Zeiten (25-40 ns; G. Renger, 1992). Analog zur Diskussion in Kap. 5.1.3 kann ein Einfluß von PS I ausgeschlossen werden, da die chemische Oxidation der Proben durch Kaliumhexacyanoferrat(III) zu keiner Veränderung der Spektren führte.

Die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren von *C. vulgaris* bzw. Chloroplasten und *A. variabilis* können daher aus dem unterschiedlichen Aufbau der Antennensysteme erklärt werden, der sich u.a. in den Absorptionsspektren widerspiegelt (s. Kap. 3.1). Bei *A. variabilis* findet sich ein sehr breites Absorptionsmaximum zwischen 550 und 650 nm, das, wie bereits in Kap. 5.1 diskutiert wurde, auf die Phycobilisomen zurückzuführen ist. In diesem Bereich weist *C. vulgaris* eine sehr geringe Absorption auf. Eine Unterscheidung zwischen LHC II und Kernantenne ist bei *C. vulgaris* aufgrund der Absorptionsspektren nicht möglich. Im

Emissionsspektrum ist ebenfalls nur ein Maximum bei 684 bzw. 686 nm zu registrieren, bei dem es sich daher um Fluoreszenz aus dem LHC II und aus der Kernantenne von PS II handeln muß.

Für das Auftreten nur eines Fluoreszenzmaximums, das sowohl der Emission aus dem LHC II, als auch aus der Kernantenne zugeschrieben werden kann, können zwei Ursachen verantwortlich sein. Entweder wird die Anregung im LHC II so effizient an die Kernantenne weitergeleitet, daß nur eine sehr geringe Fluoreszenz auftritt, oder die spektrale Zusammensetzung der beiden Antenne ist identisch. Eine Unterscheidung ergibt sich aus der Analyse der Temperaturabhängigkeit der Spektren. Die Untersuchungen dazu wurden zwischen 295 K und 178 K durchgeführt. Wie bereits im Kap. 5.1.3 diskutiert, ist schon bei Werten von 250 K die Funktionsfähigkeit der Membran gestört. Im darunterliegenden Temperaturbereich ergeben sich durch das Aufbrechen der Zellen noch stärkere Auswirkungen auf den Photosyntheseapparat. Eine effektive Ankopplung des LHC II an die Kernantenne ist daher nicht mehr gegeben und die Anregung kann nur durch strahlende (Fluoreszenz) und nicht-strahlende Prozesse innerhalb des LHC II abgegeben werden. In den Spektren war jedoch im untersuchten Temperaturintervall keine Veränderung zu beobachten, insbesondere ergab sich kein zusätzliches Maximum, das der Fluoreszenz aus dem LHC II zugeordnet werden könnte. Dieses Verhalten ist nur durch eine identische spektrale Zusammensetzung von LHC II und Kernantenne zu erklären.

Bei *C. vulgaris* liegen die Werte für die erste Abklingzeit τ_1 bei 295 K zwischen 600 und 800 ps. Da die Oxidation von PS I durch Kaliumhexacyanoferrat(III) zu keiner Veränderung von τ_1 führte, kann der Fluoreszenzanteil von PS I als vernachlässigbar angesehen werden. In Übereinstimmung mit der Diskussion in Kap. 5.1.3 muß τ_1 bei diesen Proben als Zeitdauer für Anregungseinfang, Transfer bis zum primären Donor und Ladungstrennung interpretiert werden. Die natürliche Lebensdauer einer Anregung in einem Antennenkomplex (ca. 3–4 ns, siehe Diskussion von τ_2) wird damit durch den Quenchingprozeß am primären Donor verkürzt.

Diese Interpretation von τ_1 wird gestützt durch die Ergebnisse bei Proben mit DCMU bzw. unter stark reduzierenden Bedingungen.

Die Zugabe von DCMU führt nach einer Anregung des Reaktionszentrums zur Reduktion von Q_A , da der Elektronentransfer von Q_A nach Q_B blockiert ist. Wie bereits in Abschnitt 5.1.3 erläutert, muß diese Reduktion von Q_A für die Zeitdauer des Experimentes als irreversibel angesehen werden. Die Rückreaktion (Rekombination der Ladungen, Zeitkonstante: \sim ms) wird durch die vergleichsweise schnelle Reduktion von $P\ 680^+$ über den wasserspaltenden Komplex ($\tau_{1/2} = 23$ ns; H.T. Witt et al., 1986) verhindert. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von F.J.E. van Mieghem et al. (1989) konnte bei der Diskussion der Untersuchungen an *A. variabilis* gezeigt werden, daß eine negative Ladung am Chinon (Q_A^-) jede weitere Ladungstrennung im primären Donor $P\ 680$ unterbindet. Eine Abgabe der Anregungsenergie an den primären Donor ist in diesem Fall nicht möglich, sondern die Anregung muß über andere Kanäle abgegeben werden. Als Folge davon müßte die Fluoreszenzintensität vom F_0 -Niveau (alle Zentren im offenen Zustand) auf das F_{max} -Niveau (alle Zentren geschlossen) steigen. Der Intensitätsunterschied zwischen diesen beiden Zuständen beträgt im Mittel einen Faktor 5 (A.R. Holzwarth, 1987). Diese charakteristische Intensitätssteigerung kann hier bei den Proben mit DCMU beobachtet werden (Abb. 5.8).

Für die Abklingzeit einer Anregung in der Antenne ist darüberhinaus eine Verlängerung zu erwarten, da die Ladungstrennung als schneller Quenchingprozeß wegfällt und eine Energie-

abgabe nur über interne Prozesse möglich ist. Letztere zeichnen sich jedoch durch längere Zeitkonstanten aus (siehe Diskussion von τ_2 , Kap. 5.1.3). In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigt sich bei der Abklingzeit τ_1 eine Verlängerung bis auf Werte von 2 ns für Proben mit DCMU (Abb. 5.12).

Die beobachteten Veränderungen bei der Chloroplastenprobe unter stark reduzierenden Bedingungen lassen sich durch den gleichen Mechanismus erklären. Im Gegensatz zum analogen Versuch mit intakten Zellen (Kap. 5.1.3) kann in diesem Fall das Reduktionsmittel Natriumdithionit in die Chloroplasten eindringen, da die schützende Zellwand fehlt. Die bereits in Abschnitt 5.1.3 erwähnte Abhängigkeit des Redoxpotentials von Natriumdithionit vom pH-Wert bewirkt, daß Q_B im PS II bei dem innerhalb der Chloroplasten herrschenden pH-Wert reduziert wird. Der Elektronentransport ist damit, völlig analog zur Wirkung von DCMU bei *C. vulgaris*, unterbrochen. Die nachfolgende lichtinduzierte Reduktion von Q_A führt zur Unterbindung weiterer Ladungstrennungen an P 680. Die Abklingzeit τ_1 verlängert sich auch hier auf ca. 2 ns (Abb. 5.15) und die Fluoreszenzintensität steigt um einen Faktor 5 auf den F_{max} -Wert (Abb. 5.11).

Bei 253 K ist dagegen weder spektral noch in der Abklingzeit τ_1 eine Wirkung von DCMU in den Chlorellaprobe festzustellen (Abb. 5.8 und 5.13). Die Chloroplasten zeigen ein völlig analoges Verhalten (Abb. 5.10 und 5.14). Dies läßt auf eine Temperaturabhängigkeit der Wirkung von DCMU, hervorgerufen durch Veränderungen in der Membran oder der Proteine, schließen. Frühere Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe (H. Krause, 1986) zur Wirkung von DCMU auf die verzögerte Fluoreszenz weisen ebenfalls auf eine verminderte Wirkung mit abnehmender Temperatur hin. Der Temperatureffekt wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Wie bereits in der Diskussion der Ergebnisse an *A. variabilis* ausgeführt, wird die Abklingzeit τ_2 bei *C. vulgaris* dem Fluoreszenzabklingen von Antennenkomplexen zugeschrieben, die keine Anbindung an ein Reaktionszentrum besitzen (G.H. Schatz, A.R. Holzwarth, 1986). Für die Experimente mit Chloroplasten ist diese Zuordnung nicht mehr eindeutig möglich, da aufgrund der Präparation keine homogene Probenzusammensetzung vorliegt. Die Probe enthält hier neben aufgebrochenen Chloroplasten (ca. 30 %) auch freies Chlorophyll. Vor allem die in der letzten Spalte von Tab. 5.3 aufgelisteten Zeiten liegen in sehr guter Übereinstimmung mit der Fluoreszenzlebensdauer von freiem Chl a. J.S. Connolly et al. (1982) fanden in Abhängigkeit von der Konzentration Werte zwischen 6.0 und 7.5 ns. A. Agostiano et al. (1987) geben einen Wert von 6.5 ns an. Es ist daher anzunehmen, daß die lange Abklingzeit bei den Chloroplastenproben sich aus dem Fluoreszenzabklingen von freiem Chlorophyll und von nicht angebundenen Antennenkomplexen zusammensetzt. Eine genaue Bestimmung war jedoch wegen des hohen Rauschanteils im Signal nicht möglich.

Die Untersuchungen an *C. vulgaris* und Chloroplasten erbrachten damit folgende Ergebnisse:

- *In vivo* beträgt die Zeitdauer für den Einfang eines Photons, den Transfer der Anregung zum primären Donor und die anschließende Ladungstrennung zwischen 600 und 800 ps.
- Auch bei diesen Proben konnte kein Fluoreszenzanteil des Photosystems I festgestellt werden.
- LHC II und Kernantenne im Photosystem II sind spektral analog aufgebaut.

- DCMU zeigt eine temperaturabhängige Wirkung.
- Die Reduktion von Q_A verhindert eine Ladungstrennung am Photosystem II.
- Die lange Abklingzeit τ_2 konnte auch bei Grünalgen und Chloroplasten als prompter Fluoreszenz von nicht angebundenen Antennenkomplexen identifiziert werden. In Abhängigkeit von der Präparation ergibt sich bei Chloroplasten ein von freiem Chlorophyll herrührender Fluoreszenzanteil.

Kapitel 6

Photosystem I

Die Ergebnisse des letzten Kapitels zeigen, daß das PS I unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen in vivo fluoreszenzspektroskopisch nicht zu erfassen ist. Daher wurden Untersuchungen an isolierten PS I-Reaktionszentren durchgeführt. Die Proben wurden aus Spinat und Anabaena variabilis gewonnen (s. Kap. 3.3). Sie enthalten neben der vollständigen Akzeptorkette noch ca. 80-100 Antennenpigmente.

Die Ausstattung des Labors für zeitaufgelöste Spektroskopie erlaubte es, ein relativ großes Zeitfenster ($100 \text{ ps} < t < 0.5 \text{ ms}$) zu untersuchen. Damit war die Möglichkeit gegeben, sowohl das Langzeitverhalten der Fluoreszenz aufzuklären, als auch Informationen über den Anregungstransfer in der Antenne zu erhalten. In Abschnitt 6.1 sind die Untersuchungen im Zeitbereich $t > 100 \text{ ns}$ bis $< 0.5 \text{ ms}$ beschrieben. Die Experimente im sub-ns-Zeitbereich werden in Abschnitt 6.2 vorgestellt.

6.1 Fluoreszenz im μs - und ns-Zeitbereich

6.1.1 Anregung mit ns-Pulsen

Die Untersuchungen wurden mit dem in Kap. 4.3 beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt. Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz wird dabei mit einem 64-Kanal-Zähler registriert. Die kleinste einstellbare Kanalbreite beträgt 100 ns . Ohne einer eingehenderen Diskussion vorgreifen zu wollen, sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß bei der Darstellung der Fluoreszenzspektren in der Regel nur das Ergebnis eines Zeitkanales wiedergegeben wird. In der jeweiligen Bildunterschrift ist dies durch die Angabe ' $\Delta t = 100 \text{ ns}$ ' angezeigt.

Die Anregung erfolgte mit einem Argonionenlaser mit Cavity-Dumper. Wie bereits in Kap. 4.1 erwähnt lassen sich dadurch Pulse mit Halbwertsbreiten von 15 ns bis in den μs -Bereich erzeugen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden zuerst die Ergebnisse nach einer Anregung mit einem 15 ns -Laserpuls diskutiert und erst in einem zweiten Schritt kurz die Auswirkung einer Verlängerung der Pulshalbwertsbreite dargestellt. Wenn nicht anders erwähnt beziehen sich die Abbildungen auf eine Pulswiederholrate von 41 kHz .

Abb. 6.1 zeigt das Spektrum einer Probe mit PS I-Reaktionszentren (PS I-RZ) von *A. variabilis* (ohne Zusätze) bei 290 K nach Anregung mit einem 15 ns -Puls. Das Maximum der Intensität liegt bei 676 nm . Auf der kurzwelligen Seite erfolgt der Anstieg sehr steil ab ca. 660 nm , während auf der langwelligen Flanke im Bereich 700 bis 735 nm ein leichtes Plateau

auftritt.

Wie in Abb. 6.1 außerdem zu erkennen ist, weist die aus Spinat gewonnene Probe ein völlig analoges Verhalten auf. Dies bezieht sich nicht nur auf Lage und Halbwertsbreite der Maxima, sondern auch auf die Höhe der absoluten Intensität. Auch bei den übrigen in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen konnte kein Unterschied zwischen Proben aus Spinat und aus *A. variabilis* festgestellt werden. Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten werden im folgenden daher die Ergebnisse jeweils nur für eine Probe gezeigt.

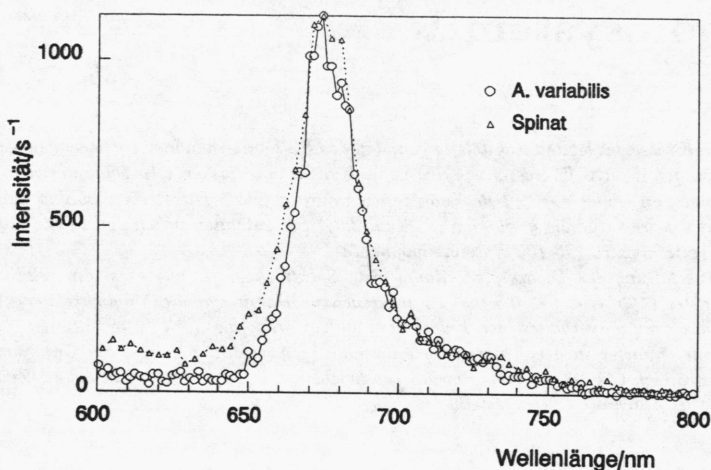


Abb. 6.1: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von Spinat und *A. variabilis* nach einem 15 ns Puls ohne Zusätze bei 290 K, $\Delta t = 100$ ns

Eine Reduktion der Proben mit Ascorbat (Vitamin C) oder mit Natriumdithionit führte bei 285 K zu keiner Veränderung der Spektren (Abb. 6.2).

Bei den Proben ohne Zusätze bzw. mit Ascorbat als Reduktionsmittel bewirkte auch eine Variation der Temperatur keine Änderungen des spektralen Verhaltens. Für diese Untersuchungen wurden Messungen bei 120 K, 70 K und 2 K durchgeführt. Nur bei den Spektren bei 2 K trat eine Verschmälerung des Peaks um ca. 20 % auf, die durch die geringere Besetzungsdichte höherer Schwingungszustände erklärt werden kann.

Ein anderes Bild ergibt sich bei den Proben mit Natriumdithionit als Reduktionsmittel (Abb. 6.3). Hier zeigen die bei 70 K und bei 2 K gewonnenen Spektren im Vergleich zur Messung bei 281 K eine deutliche Verschiebung des Maximums um 4 nm hin zu größeren Wellenlängen ($\lambda_{max} = 680$ nm).

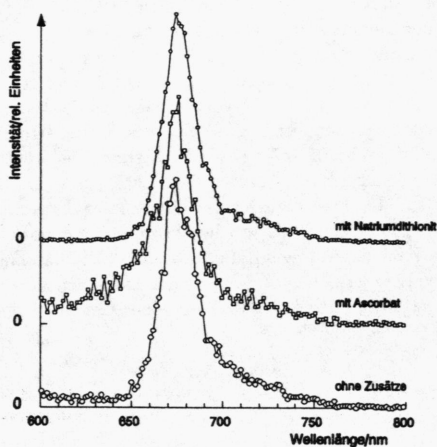


Abb. 6.2: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von *A. variabilis* bei 285 K nach einem 15 ns Puls ohne Zusätze, mit Ascorbat und mit Natriumdithionit, $\Delta t = 100$ ns (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

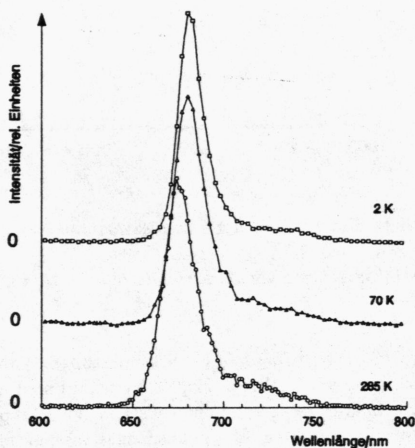


Abb. 6.3: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von *A. variabilis* mit Natriumdithionit nach einem 15 ns Puls bei 285 K, 70 K und 2 K, $\Delta t = 100$ ns (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

Alle hier beschriebenen Variationen der experimentellen Bedingungen (Reduktion der Proben und/oder Absenkung der Temperatur) blieben ohne Auswirkungen auf das zeitliche Verhalten der Fluoreszenzintensität. Exemplarisch ist die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz in Abb. 6.4 dargestellt. Die Breite eines Zeitkanales beträgt 100 ns. Die Anregung mit einem 15 ns-Puls erfolgte am Ende des dritten Zeitkanals. Wie aus der Abbildung ersichtlich kann in den auf die Anregung folgenden Zeitkanälen nur das Rauschsignal des Photomultipliers registriert werden. Das schwach erkennbare zweite Maximum bei 1500 ns ist auf einen nicht vollständig unterdrückten Folgepuls des Lasers zurückzuführen. Ein auf verzögerte Fluoreszenz hinweisender Verlauf der Fluoreszenz konnte bei diesen Experimenten in keinem Fall beobachtet werden. Bei 285 K und 70 K wurden darüberhinaus noch Messungen bis in den Zeitbereich von 500 μ s nach der Anregung durchgeführt, ohne daß eine Veränderung dieses Verhaltens gefunden wurde. Auf der Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen kann daher eine verzögerte Fluoreszenz im PS I mit einer Genauigkeit von 10^{-5} ausgeschlossen werden.

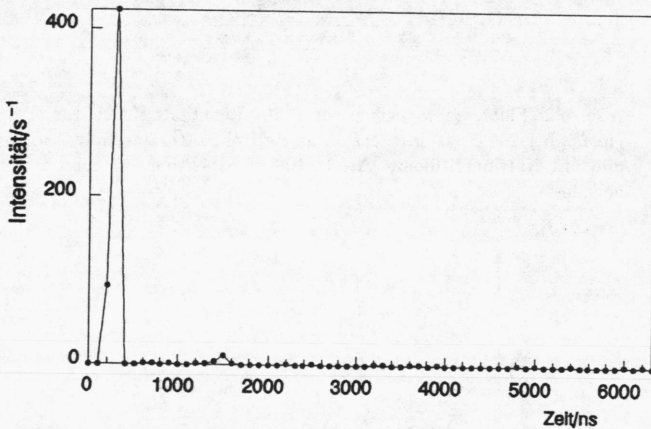


Abb. 6.4: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 680 nm nach Anregung mit einem 15 ns-Laserpuls;
Probe: PS I-Reaktionszentren von *A. variabilis* ohne Zusätze, $T = 285$ K

Für die Zuordnung des Maximums bei 676 nm (Abb. 6.1 und Abb. 6.2) muß die Zusammensetzung der Proben berücksichtigt werden. Wie in Kap. 3.3 erwähnt sind in den hier benutzten Präparationen neben dem primären Donor und der vollständigen Akzeptorkette noch ca. 80 bis 100 Antennen-Chl *a*-Moleküle enthalten. Das in den Emissionsspektren beobachtete Maximum ist auf diese Antennenpigmente zurückzuführen, da die anderen Komponenten entweder eine größere Absorptionswellenlänge besitzen, oder eine andere Zeitabhängigkeit aufweisen müßten. Innerhalb eines Zeitkanales, d.h. innerhalb von 100 ns, verringert sich die Fluoreszenz nach einer 15 ns-Anregung auf den Wert der Nullrate. Auch eine Abkühlung der Proben auf 2 K veränderte dieses Verhalten nicht. Aus dem Vergleich mit den in Abschnitt 2.4.2 angeführten Transfer- und Rekombinationszeiten ergibt sich, daß die hier beobachtete Emis-

sion von prompter Fluoreszenz herrührt. Eine Verringerung der Temperatur auf Werte unter 70 K hätte selbst für den schnellsten Rekombinationsprozeß ($P\ 700^+ A_1^- \rightarrow P\ 700\ A_1$) eine Verlängerung der Halbwertszeit auf 120 ns zur Folge und müßte daher zu einer Veränderung des Zeitverhaltens führen. Eine derartige Veränderung konnte aber in keinem Fall beobachtet werden.

Als Konsequenz des hier beobachteten Zeitverhaltens ergibt sich, daß das PS I keine verzögerte Fluoreszenz aufweist, zumindest nicht im Spektralbereich 600 bis 800 nm. Um zu überprüfen, ob das Fehlen von verzögerter Fluoreszenz auf zu kurze Anregungspulse zurückzuführen ist, wurden alle Experimente mit 50 ns-Pulsen wiederholt. Dies ergab keine Änderung des Zeitverhaltens. Eine Verlängerung des Anregungspulses über diesen Wert hinaus ist nicht sinnvoll, da sie zu einer unsymmetrischen Veränderung der Pulsamplitude führt. Derartige Veränderungen konnten bereits bei 40 ns-Pulsen beobachtet werden. Sie treten auf, wenn die Pulslänge deutlich über der Erholzeit des Lasers liegt. Aus diesem Grund wurde versucht durch eine sehr schnelle Pulssequenz eine quasi-kontinuierliche Anregung über einen längeren Zeitraum hinweg zu simulieren. Diese Pulssequenz bestand aus 15 ns-Pulsen, die 10 μ s lang mit einer Wiederholfrequenz von 10 MHz ausgestrahlt wurden. Der Beobachtungszeitraum bei diesen Experimenten betrug 0.5 ms. Untersuchungen an Anabaenapollen ohne Zusätze, bzw. mit Natriumdithionit bei 285 K, 70 K und 2 K, sowie an mit Ascorbat reduzierten Proben bei 285 K und 125 K erbrachten auch unter diesen Bestrahlungsbedingungen keinen Hinweis auf verzögerte Fluoreszenz. Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität zeigte einen zur Abb. 6.4 analogen Verlauf.

Für das Fehlen von Rekombinationsfluoreszenz können verschiedene Gründe verantwortlich sein:

a) eine Rekombination findet unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht statt, da die Wiederholraten von 41 kHz groß sind gegen die Rekombinationsraten, d.h. der primäre Donor liegt immer im oxidierten Zustand vor. Demgegenüber laufen die von A_0 bzw. A_1 ausgehenden Rückreaktionen auf einer ns- bis μ s-Zeitskala ab (s. Kap. 2.4.2). Um zumindest tendenziell zu überprüfen, ob die Wiederholraten zu groß gewählt waren, wurden bei 285 K Experimente mit einer Wiederholrate von 10 kHz durchgeführt. Bei keiner der drei untersuchten Proben (RZ ohne Zusätze, mit Ascorbat, mit Natriumdithionit) wurde ein anderer Zeitverlauf der Fluoreszenz gefunden als der oben beschriebene.

b) Die Rekombination läuft nicht über einen angeregten $P\ 700^*$ -Zustand ab, d.h. es tritt keine Fluoreszenz auf. Diese Annahme steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen. P.V. Warren et al. (1993) schlossen aus Absorptionsmessungen an PS I-RZ denen die FeS-Akzeptoren fehlten, daß die Rekombination von A_1^- mit $P\ 700^+$ mit einer Halbwertszeit von 10 μ s direkt in den Grundzustand erfolgt. Bei einer Reduktion dieser terminalen FeS-Akzeptoren erfolgt die $P\ 700^+ A_1^-$ - Rückreaktion über die Bildung des Triplettzustandes $^3P\ 700$ (P. Sétif und H. Bottin (1989); P. Sétif und K. Brettel (1990)).

Die bei den Natriumdithionitproben aufgetretene Verschiebung des Maximums um 4 nm zu größeren Wellenlängen hin nach Abkühlung auf 70 K bzw. 2 K, konnte nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Erklärungsmöglichkeit stellt ein möglicher Einfluß der reduzierten FeS-Akzeptoren F_A^- und F_B^- dar. Da die Proben bei Licht eingefroren wurden, ergibt sich eine irreversible Reduktion dieser Akzeptoren bei Temperaturen unter 70 K (s. Kap. 2.4). Bei der hier benutzten Wiederholrate von 41.0 kHz wird der Zustand F_A^-/F_B^- auch im Verlauf des Experimentes nicht aufgehoben.

Die Einflüsse der negativen Ladungen an diesen Akzeptoren auf den Anregungs- und Ladungstransfer sind noch nicht vollständig geklärt. So berichten z.B. P. Sétif und K. Brettel

(1990) von einer Beschleunigung der Rückreaktion $P\ 700^+ A_1^- \rightarrow P\ 700\ A_1$ bei PS I-RZ von Cyanobakterien von 250 μs auf 250 ns, wenn F_X reduziert vorliegt (F_X^-). Für das hier beschriebene Experiment hätte dies zur Folge, daß neben den FeS-Akzeptoren auch der primäre Donor im reduzierten Zustand vorliegt. Wie im folgenden Abschnitt beschrieben zeigen die Spektren von chemisch oxidierten Proben nach einer 200 ps-Anregung ein Maximum bei 676 nm, während bei Proben ohne Zusätze bzw. mit Natriumdithionit das Maximum bei 680 nm liegt. Dies läßt den den Schluß zu, daß die Anregung mit einem 15 ns-Puls ausreicht, um bei allen Reaktionszentren den primären Donor zu oxidieren, ausgenommen bei den Proben mit Natriumdithionit bei tiefen Temperaturen. In letzterem Fall wird die Ladungstrennung unterbunden.

Da auch eine Verlängerung der Anregungspulse keine Verschiebung des Maximums zur Folge hatte, erscheint diese Annahme plausibel. Eine endgültige Überprüfung wäre jedoch nur mit zeitaufgelösten Absorptionsmessungen möglich. Damit ließe sich der Oxidationszustand des primären Donors bestimmen. Derartige Messungen sind ein interessanter Aspekt für weiterführende Untersuchungen.

6.1.2 Anregung mit 200 ps-Laserpuls

In diesem Abschnitt wird das spektrale Verhalten der PS I-Proben im Zeitbereich 100 ns bis 6.3 μs nach Anregung mit einem 200 ps-Laserpuls diskutiert. Die Pulse wurden mit einem modengekoppelten Argonlaser erzeugt (s. Kap. 4.1). Die Anregungswellenlänge betrug 496.5 nm. Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz wurde, analog zu den oben beschriebenen Messungen, mit einem 64-Kanalzähler aufgezeichnet (Kanaltbreite: 100 ns).

Ausgehend von den im letzten Abschnitt diskutierten Ergebnissen stand bei diesen Untersuchungen die Fragestellung im Vordergrund, inwieweit durch eine Verkürzung der Anregungspulse auf 200 ps das spektrale oder zeitliche Verhalten der Fluoreszenz verändert wird. Insbesondere der Einfluß des Oxidationszustandes von P 700 auf die Spektren sollte untersucht werden.

Wie in Abb. 6.5 zu sehen ist, führt die Anregung mit 200 ps-Puls im Vergleich zur 15 ns-Anregung zu einer Verschiebung des Spektrums in den roten Spektralbereich. Das Maximum liegt hier bei 680 nm, gegenüber 676 nm bei den Spektren mit 15 ns-Anregung. Darüberhinaus weist das Spektrum im Bereich 700 bis 750 nm höhere Intensität auf. Diese Verschiebung des Maximums kann bei den Proben ohne Zusätze bzw. unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden. Eine chemische Oxidation der Proben mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ergibt dagegen ein spektrales Verhalten, das dem nach einer 15 ns-Anregung ähnelt. Abb. 6.6 zeigt im direkten Vergleich den Einfluß einer chemischen Oxidation bzw. Reduktion der Proben auf die Spektren. Das Maximum der oxidierten Probe ist um 4 nm blauverschoben gegenüber der Probe ohne Zusätze. Im Bereich 700 bis 750 nm ergibt sich zudem eine deutlich geringere Intensität. Bei Zugabe von Natriumdithionit als Reduktionsmittel bleibt das Maximum bei 680 nm. Zusätzlich kann noch eine leichte Erhöhung der Emissionsintensität im langwelligen Spektralbereich zwischen 700 und 750 nm, verglichen mit der Probe ohne Zusätze, festgestellt werden.

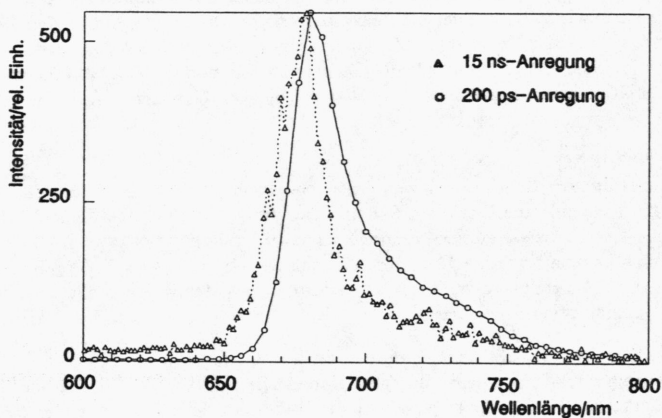


Abb. 6.5: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von *A. variabilis* mit Ascorbat nach einer 200 ps- und einer 15 ns-Anregung; $T = 124\text{ K}$, $\Delta t = 100\text{ ns}$ (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

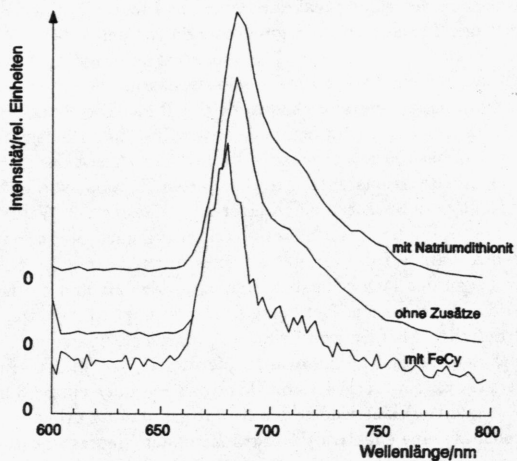


Abb. 6.6: Fluoreszenzspektren von P 700-Reaktionszentren von *A. variabilis* bei 120 K nach einem 200 ps Puls ohne Zusätze, mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (FeCy) und mit Natriumdithionit, $\Delta t = 100\text{ ns}$ (Spektren auf gleiche Höhe normiert)

Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz erfährt durch die Verkürzung der Anregungspulse keine Änderung. Völlig analog zu dem in Abb. 6.4 gezeigten Verhalten ist die Emission auf den Zeitkanal beschränkt, in dem die Anregung erfolgt. In den nachfolgenden Zeitkanälen kann kein von den Proben herrührendes Signal mehr festgestellt werden. Auch die chemische Oxidation oder Reduktion der Proben erbrachte kein anderes Bild. Da dieses Verhalten bereits im obigen Abschnitt diskutiert wurde, soll hier auf eine eigene Abbildung verzichtet werden.

Die Übereinstimmung der Spektren von oxidierten Proben mit solchen nach Anregung mit einem 15 ns-Laserpuls führt zu dem Schluß, daß der 15 ns-Puls ausreichend ist, um alle Reaktionszentren zu oxidieren. Die Fluoreszenz kann in diesem Fall folglich nur von Antennenpigmenten emittiert werden. Andererseits muß auf Grund des zeitlichen Verhaltens, wie in Abschnitt 6.1.1 bereits ausgeführt, das Maximum bei 680 nm ebenfalls der Fluoreszenz aus Antennenmolekülen zugeschrieben werden.

Ein von der Tendenz her ähnliches Verhalten stellten R. Sparrow et al. (1990) für die Kurzzeitkomponente ihres Fluoreszenzabklingens fest. Auch hier ergab die Oxidation der Proben eine Blauverschiebung des Spektrums und die Reduktion eine Betonung der langwelligen Anteile. Das Ergebnis wird vor dem Hintergrund des Anregungstransfers in der Antenne diskutiert. In ähnlicher Weise können die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der reduzierten Proben interpretiert werden. Unter reduzierenden Bedingungen liegen alle Reaktionszentren vor der Anregung reduziert vor. Sie sind, im Bezug auf die Anregungsenergie, im offenen Zustand. Der Anregungspuls ist genügend kurz, damit er nur den Transfer anregt und es zu keiner zweiten Anregung desselben Reaktionszentrums innerhalb eines Pulses kommt. Die Fluoreszenz spiegelt den Transfer der Anregungsenergie von den äußeren Antennenpigmenten zum primären Donor wieder. Entsprechend der spektral heterogenen Zusammensetzung der Antenne sind auch langwellige Anteile im Emissionsspektrum vertreten.

Bei den Proben ohne Zusätze ergibt sich das gleiche Bild. Die Reaktionszentren befinden sich vor jedem Puls im offenen, d.h. aufnahmebereiten Zustand. Die leichte Verringerung der Intensität zwischen 700 bis 750 nm bei diesen Proben kann als Anzeichen gewertet werden, daß ein kleiner Teil der Reaktionszentren im oxidierten Zustand vorliegt. Aus der nur geringfügigen Veränderung des Spektrums und einer Abschätzung der Wahrscheinlichkeiten für einen Doppeltreffer (s. Kap. 4.1) kann dieser Anteil als vernachlässigbar eingestuft werden.

Bei oxidierten Proben wäre auf der Grundlage eines 'funnel'-Modelles zu erwarten, daß der Anregungstransfer bis zu den langwelligsten Pigmenten abläuft und die Energie als Fluoreszenz abgegeben wird. Dies hätte eine Betonung der langwelligen Fluoreszenz zur Folge, die im Experiment nicht auftritt. Als mögliche Erklärung führen R. Sparrow et al. eine Oxidation von Antennenmolekülen durch Kaliumhexacyanoferrat(III) an, die zu einer Unterbrechung des Energietransfers führt. Ein Vergleich mit den Spektren nach einer 15 ns-Anregung (ohne Zusatz von Oxidationsmittel) läßt jedoch den Schluß zu, daß die Abnahme der Emission im roten Spektralbereich auf eine effektive Unterdrückung der Fluoreszenz durch den oxidierten primären Donor zurückzuführen ist. Hinweise auf einen derartigen Quenchingprozeß durch $P\ 700^+$ wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden (z.B. I. Ikegami, 1976; D.R. Klug et al., 1989). Ein möglicher Einfluß der bei diesen Untersuchungen benutzten Oxidationsmittel kann aber nicht ausgeschlossen werden, sodaß diese Eigenschaft des oxidierten primären Donors bisher nicht eindeutig bestätigt wurde. Für *Hellobacterium chlorum* konnten G. Deinum et al. (1991) zeigen, daß der durch eine Blitzlichtanregung oxidierte primäre Donor die Fluoreszenz besser quencht als der reduzierte. Diese Eigenschaft von PS I und

dem Reaktionszentren von *H. chlorum* stellt möglicherweise einen Schutzmechanismus gegen Beschädigungen des Photosystems durch überhöhte Anregungsenergien dar (G. Deinum et al., 1991).

Zum spektralen und zeitlichen Verhalten der Fluoreszenz von PS I-Reaktionszentren im Zeitbereich $t > 100$ ns können damit folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- Photosystem I von Spinat und von *A. variabilis* zeigen das gleiche Verhalten.
- Eine verzögerte Fluoreszenz kann beim Photosystem I nicht beobachtet werden. Die Untersuchungen wurden dazu mit Anregungspulsen von unterschiedlicher Länge bis in den Zeitbereich von 0.5 ms ausgedehnt.
- Durch die Anregung mit einem 15 ns-Laserpuls werden alle in der Probe befindlichen Reaktionszentren oxidiert.
- Der Einfluß der oxidierten Reaktionszentren führt zu einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums um 4 nm auf 676 nm. Die relative Intensität im roten Spektralbereich (700 bis 750 nm) ist gegenüber reduzierten Proben vermindert.
- Der oxidierte primäre Donor des Photosystems I unterdrückt die Fluoreszenz mindestens ebenso gut wie der reduzierte.

6.2 Fluoreszenz im sub-ns-Zeitbereich

Zur Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens im sub-ns-Zeitbereich wurden Abklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen gemessen. Die für die Durchführung und Auswertung der Experimente wichtigen Punkte seien im folgenden kurz zusammengefaßt:

- Die Anregung erfolgte mit 200 ps-Laserpulsen bei $\lambda_{exc} = 496.5$ nm.
- Für die Untersuchungen wurden vornehmlich PS I-Reaktionszentren von *A. variabilis* benutzt. An PS I-Proben aus Spinat wurden Vergleichsmessungen bei ausgewählten Probenbedingungen durchgeführt.
- Um eine qualitative Aussage über das Temperaturverhalten machen zu können, wurden Messungen sowohl bei ca. 255 K als auch bei ca. 115 K durchgeführt.
- Die Meßkurven geben das Fluoreszenzabklingen im Zeitbereich von 0 bis 40 ns nach der Anregung wieder. Ein Vorlauf von etwa 10 ns vor dem Anregungspuls wurde zur Bestimmung der Dunkelrate mitregistriert.
- Die Auswertung des Fluoreszenzabklings erfolgte durch die Bestimmung der Abklingzeiten. Sie ergeben sich aus der Anpassung von zwei Exponentialfunktionen an die Meßkurve, wobei durch eine Faltungsoperation die endliche Breite des Anregungspulses berücksichtigt wurde (vgl. Kap. 4.4.4).
- Für die Auswertung werden neben den charakteristischen Zeiten τ_1 und τ_2 der Exponentialfunktionen vor allem die zeitliche Entwicklung der Spektren, wie sie in den 3-dimensionalen Darstellungen zu Ausdruck kommt, herangezogen.
- Der Fehler bei der Bestimmung von τ_1 beträgt ± 75 ps, für τ_2 ergibt sich ± 0.5 ns.

Um eine irreversible Photooxidation der in der Probe befindlichen Reaktionszentren durch zu hohe Wiederholraten zu vermeiden, wurden zuerst die für die Durchführung der Untersuchungen geeigneten Wiederholraten ermittelt. Bei den Messungen im höheren Temperaturbereich

konnte kein Unterschied im spektralen und zeitlichen Verhalten zwischen Anregungen mit einer Wiederholrate von 4.1 kHz und 41.0 kHz festgestellt werden. Bei 120 K zeigten einige Proben eine überproportionale Verstärkung der Emission im Bereich 676 bis 680 nm nach Anregung mit 41.0 kHz Wiederholrate, was auf einen deutlichen Anteil an oxidierten Reaktionszentren schließen läßt. Daher wurden bei diesen Temperaturen die Messungen mit einer Wiederholrate von 4.1 kHz durchgeführt.

Da die Experimente unter stark reduzierenden Bedingungen nur bei einem pH-Wert von > 10 durchgeführt werden können, d.h. mit Glycin-Puffer als Medium, wurde zusätzlich abgeklärt, ob die beiden hier verwendeten Pufferlösungen (Glycin- bzw. TT-Puffer) zu Veränderungen des spektralen oder zeitlichen Verhaltens führen. Derartige Veränderungen waren jedoch nicht zu beobachten.

Aus apparativen Gründen war eine Vergleichbarkeit der experimentellen Ergebnisse nur gewährleistet, wenn eine Meßreihe, d.h. ein Satz von Abklingkurven bei verschiedenen Wellenlängen, an einer Probe gemessen wurde. Aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensität im Bereich $\lambda_{em} > 740$ nm dauerte eine derartige Meßreihe ca. 4 h. In Voruntersuchungen wurde daher ermittelt, inwieweit über diesen Zeitraum hinweg Probendegradation eintritt. D.F. Bocian et al. (1987) berichten bei Experimenten an Reaktionszentren von Purpurbakterien von einer begrenzten Stabilität der Proben. Durch eigene Kontrollspektren, die vor und nach jeder Meßreihe aufgenommen wurden, wurde das Ausmaß der Probenschädigung durch die Laserbestrahlung abgeschätzt. Die Gesamtintensität verringerte sich nach den Meßreihen nur um ca. 10 %, und zwar gleichmäßig über das ganze Spektrum hinweg. Da sich zudem die Abklingzeiten bei Kontrollmessungen nicht veränderten, wurde der durch eine Probendegradation hervorgerufene Effekt als vernachlässigbar angesehen.

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse bei verschiedenen Redoxzuständen des Reaktionszentrums vorgestellt. Die Diskussion erfolgt dann in einem zweiten Schritt, da eine Interpretation der Abklingzeiten und Spektren nur unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Redoxzustände möglich ist.

6.2.1 Zeitaufgelöste Spektren und Abklingverhalten

Proben ohne Zusatz

Die Abklingkurven wurden im Abstand von 10nm aufgenommen. In der ersten dreidimensionalen Darstellung wurden zur Verdeutlichung des Verfahrens bei drei Wellenlängen die Meßpunkte mit eingetragen (s. Abb. 6.7). Aus programmtechnischen Gründen mußte für den zeitlichen Abstand der querverlaufenden Linien (Spektren) ein Wert von 400 ps gewählt werden.

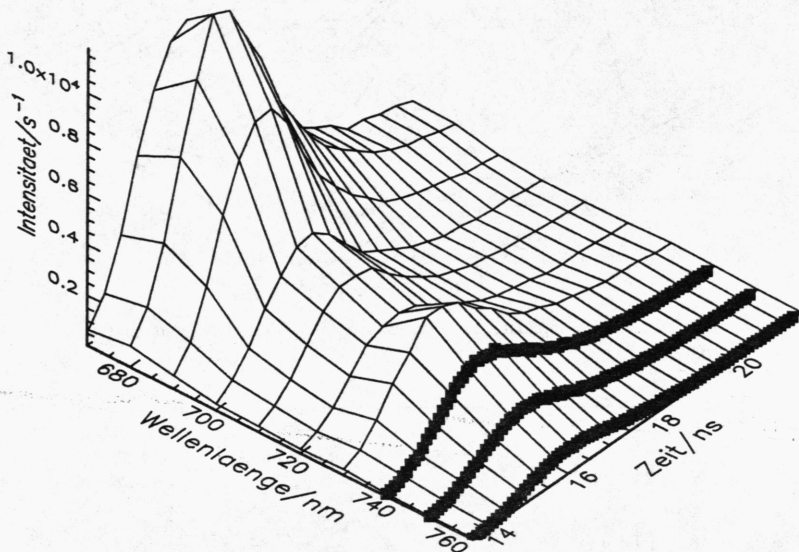


Abb. 6.7: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 258 K

Das Fluoreszenzverhalten von PS I-RZ von *A. variabilis* wird bei 258 K durch ein sehr breites Maximum um 680 nm bestimmt (Abb. 6.7). Dieses Maximum verändert seine Lage über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg nicht. Zwischen 700 und 720 nm ist ein Minimum (Sattel) zu erkennen, während bei 730 nm ein Nebenmaximum auftritt. Der Anstieg der Fluoreszenz erfolgt bei allen Wellenlängen gleich, die maximale Intensität wird zum selben Zeitpunkt erreicht.

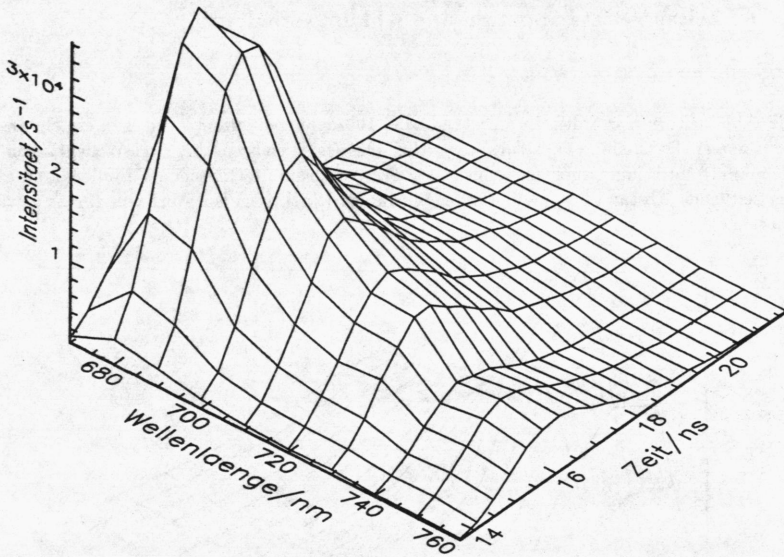


Abb. 6.8: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 117 K

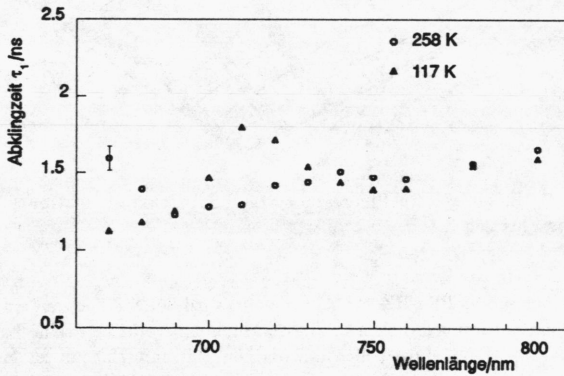


Abb. 6.9: τ_1 von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 258 K und 117 K ($\Delta\tau_1 = \pm 75$ ps)

Eine Abkühlung auf 117 K führt zu deutlichen Veränderungen des spektralen Verhaltens (Abb. 6.8). Das Hauptmaximum liegt nicht mehr eindeutig bei 680 nm, sondern es verbreitert sich auf den Bereich 680 - 690 nm. Während die Intensität bei 670 nm noch den gleichen Betrag wie bei 258 K hat, erfolgt im Maximum eine Erhöhung um den Faktor 3. Zwischen 680 und 720 nm nimmt die Intensität ab und bei 730 nm ist ein Plateau zu erkennen. Ein Sattelpunkt wie bei der höheren Temperatur tritt nicht auf. Zwischen 730 und 740 nm fällt die Intensität stark ab.

Der Anstieg der Fluoreszenz erfolgt über alle Wellenlängen hinweg nicht zum gleichen Zeitpunkt, sondern setzt zwischen 700 und 720 nm mit einer zeitlichen Verschiebung ein. Die maximale Intensität wird hier ca. 0.4 ns später erreicht als bei 680 nm. Die Kurve bei 730 nm erreicht dagegen das Maximum gleichzeitig mit der bei 680 nm.

Das Verhalten auf der bezüglich der Zeitachse abfallenden Seite der Meßkurven wird durch die Abklingzeiten τ_1 und τ_2 beschrieben.

Bei 258 K variiert τ_1 zwischen 1.2 und 1.6 ns, wobei der größte Wert bei 670 nm erreicht wird (Abb. 6.9). Mit steigender Wellenlänge nimmt τ_1 ab bis zum kleinsten Wert bei 690 nm. Im langwelligen Bereich ab ca. 740 nm liegt sie bei etwa 1.5 ns.

Bei 117 K zeigt sich im kurzwelligen Bereich ein umgekehrtes Verhalten. Vom niedrigsten Wert bei 670 nm (1.1 ns) steigt τ_1 an, erreicht bei 710 nm 1.8 ns und fällt anschließend ab auf Werte von 1.4 bis 1.5 ns bei $\lambda_{em} > 740$ nm.

Bei den an PS I-RZ von Spinat durchgeführten Vergleichsmessungen ergibt sich für τ_1 bei 258 K ein Wert von 1.7 ns, wobei im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Variation mit der Wellenlänge beobachtet wird. Bei 117 K steigt τ_1 von 1.5 ns (670 nm) auf 2.1 ns (710 nm) kontinuierlich an und bleibt für $\lambda_{em} > 710$ nm bei diesem Wert.

λ_{em}/nm	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	780	800
τ_2/ns (T = 258 K)	3.2	3.4	3.1	3.3	3.2	3.4	3.3	3.2	3.3	3.4	3.4	3.7
τ_2/ns (T = 117 K)	3.5	3.5	3.4	3.6	4.0	3.7	3.6	3.6	3.7	3.5	3.6	3.6

Tabelle 6.1: Abklingzeit τ_2 von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei zwei Temperaturen ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns)

Die für τ_2 errechneten Werte werden analog zum vorherigen Kapitel tabellarisch wiedergegeben (Tab. 6.1). Eine signifikante Abhängigkeit von der Wellenlänge oder der Temperatur konnte nicht festgestellt werden. Die Werte liegen zwischen 3.0 und 4.0 ns.

Reduziertes PS I

Da die Untersuchungen im ns- und μ s-Zeitbereich zeigten, daß ein Anteil an oxidierten Reaktionszentren bei den Proben ohne Zusätze nicht ausgeschlossen werden kann, wurden Messungen mit verschiedenen Reduktionsmitteln durchgeführt. Durch Ascorbinsäure bzw. Natriumdithionit bei pH 8.1 wird der primäre Donor reduziert. Dabei ergaben sich keine Veränderungen zu den im obigen Abschnitt beschriebenen Spektren und Abklingzeiten.

Erst unter stark reduzierenden Bedingungen, d.h. der Zugabe von Natriumdithionit bei pH 10.5, konnte ein anderes Verhalten beobachtet werden. Stark reduzierende Bedingungen bedeutet, daß neben dem primären Donor auch die terminalen FeS-Akzeptoren F_A und F_B reduziert werden. Dies ist möglich aufgrund der pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials von Natriumdithionit.

Bei 258 K weist die dreidimensionale Darstellung der Abklingkurven ein Maximum bei 680 nm auf. Im Vergleich zur Probe ohne Zusätze ist eine deutliche Verschmälerung des Maximums festzustellen. Die Intensität liegt um ca. 20% über der ohne Zusätze. Ein zweites Maximum tritt unter stark reduzierenden Bedingungen nicht auf. Die Intensität fällt vom Maximum her auf der langwelligen Seite bis 700 nm kontinuierlich ab, dem sich bis 740 nm ein Plateaubereich anschließt. Über den ganzen Wellenlängenbereich hinweg wird das Intensitätsmaximum zum gleichen Zeitpunkt erreicht.

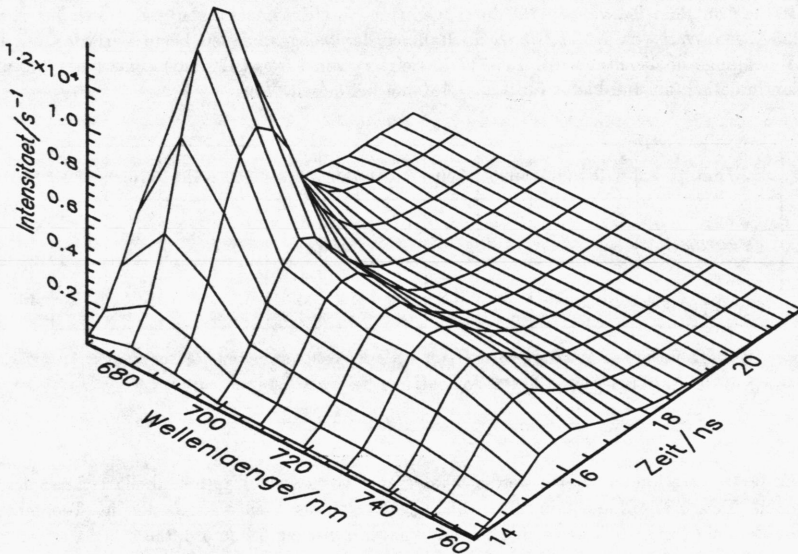


Abb. 6.10: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) unter stark reduzierenden Bedingungen bei 258 K

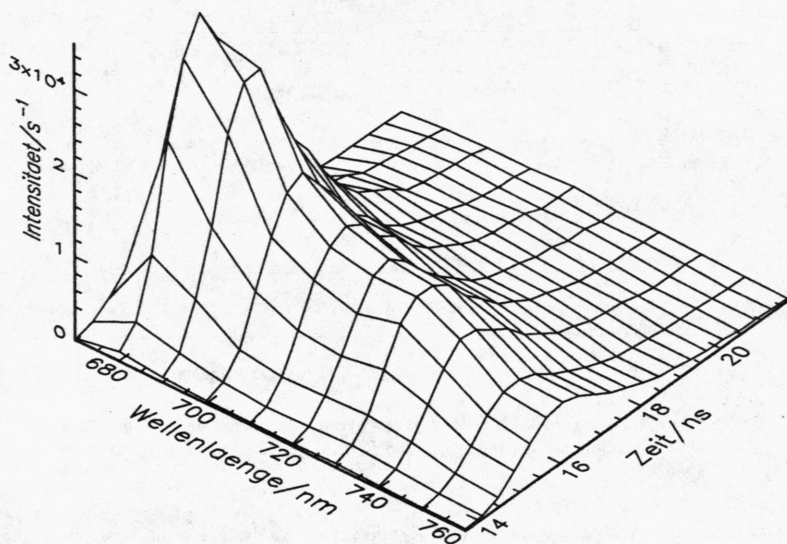


Abb. 6.11: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) unter stark reduzierenden Bedingungen bei 123 K

Die im tieferen Temperaturbereich durchgeführte Messung (hier bei 123 K, Abb. 6.11) weist die gleichen Charakteristika auf wie die entsprechende Meßreihe ohne Zusätze (vgl. Abb. 6.8). Bei 680 - 690 nm tritt ein breites Maximum auf. Die Intensität liegt auch in diesem Fall um einen Faktor 3 über derjenigen bei 258 K. Der Plateaubereich auf der langwelligen Flanke des Maximums verläuft zwischen 700 und 730 nm. Zwischen 690 und 720 nm ist zu erkennen, daß die maximale Intensität ca. 400 ps später erreicht wird als bei 680 bzw. 730 nm.

Den Verlauf der Abklingzeit τ_1 bei den zwei Temperaturen zeigt Abb. 6.12. Bei 258 K liegt τ_1 nahezu konstant bei 1 ns. Das Fluoreszenzabklingen ist damit deutlich schneller als bei den Proben ohne Zusätze, was auch aus dem Vergleich der dreidimensionalen Spektren deutlich wird.

Für 123 K weist τ_1 ein anderes Verhalten auf. Von 1 ns bei 670 nm steigen die Werte kontinuierlich an, bis bei 710 nm ein Maximalwert von 2.0 ns erreicht wird. Im langwelligen Bereich mit $\lambda_{em} > 710$ nm bewegt sich τ_1 zwischen 1.5 und 2.0 ns.

Untersuchungen an PS I-RZ von Spinat unter stark reduzierenden Bedingungen erbrachten ein von der Tendenz her analoges Ergebnis. Bei 258 K ergibt sich ein über den Wellenlängenbereich von 670 bis 840 nm konstanter Wert von 1.6 ns, während bei 108 K ein Anstieg von τ_1 zwischen 670 (1.5 ns) und 710 nm (3.0 ns) beobachtet wird. Anschließend fällt τ_1 auf Werte zwischen 2.0 und 2.5 ns ab.

Tab. 6.2 gibt den Verlauf von τ_2 bei den hier gemessenen Temperaturen wieder. τ_2 variiert bei 258 K nur wenig. Die Werte liegen zwischen 2.5 und 3.0 ns. Bei 123 K ist eine größere

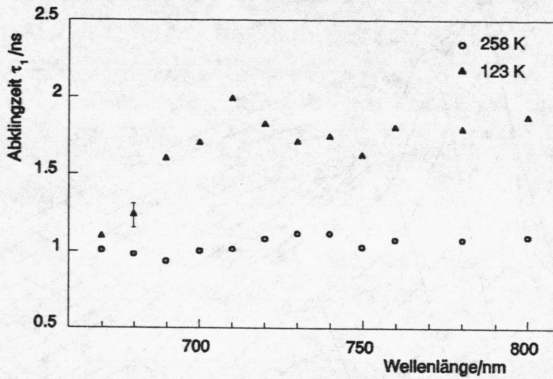


Abb. 6.12: τ_1 von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) unter stark reduzierenden Bedingungen bei 258 K und 123 K ($\Delta\tau_1 = \pm 75$ ps)

Variation zu beobachten, die jedoch nicht signifikant ist, da der Fehler in der Auswertung bei dieser Messung größer angesetzt werden muß (± 0.75 ns). Der größere Fehler ist bei dieser Meßreihe bedingt durch die extrem niedrigen Absolutwerte der Fluoreszenz im auslaufenden Bereich der Abklingkurven. Dadurch war eine eindeutige Anpassung der Fitkurve nicht möglich. Sowohl der χ^2 -Parameter, als auch der Residuenplot veränderten sich bei Variation von τ_2 nur sehr wenig. Im Mittel liegt τ_2 hier bei ca. 4 ns.

λ_{em}/nm	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	780	800
τ_2/ns (T = 258 K)	2.3	3.0	2.7	2.8	2.6	2.6	2.8	2.9	2.6	2.8	2.8	2.8
τ_2/ns (T = 123 K)	3.2	3.1	3.4	3.7	4.7	4.2	3.7	4.4	4.4	4.2	3.6	4.2

Tabelle 6.2: Abklingzeit τ_2 von PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) unter stark reduzierenden Bedingungen in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei zwei Temperaturen, ($\Delta\tau_2 : \pm 0.5$ ns (bei 258 K) bzw. ± 0.75 ns (bei 123 K))

Oxidiertes PS I

Die chemische Oxidation des primären Donors zu $P\ 700^+$ erfolgte mit Kaliumhexacyanoferrat(III). Aus apparativen Gründen konnten bei 242 K nur Abklingkurven bei folgenden Wellenlängen gemessen werden: 680 nm, 700 nm, 710 nm, 720 nm, 740 nm, 760 nm. Die

übrigen in Abb. 6.13 eingezeichneten Abklingkurven stellen Interpolationen auf der Basis der benachbarten Kurven dar.

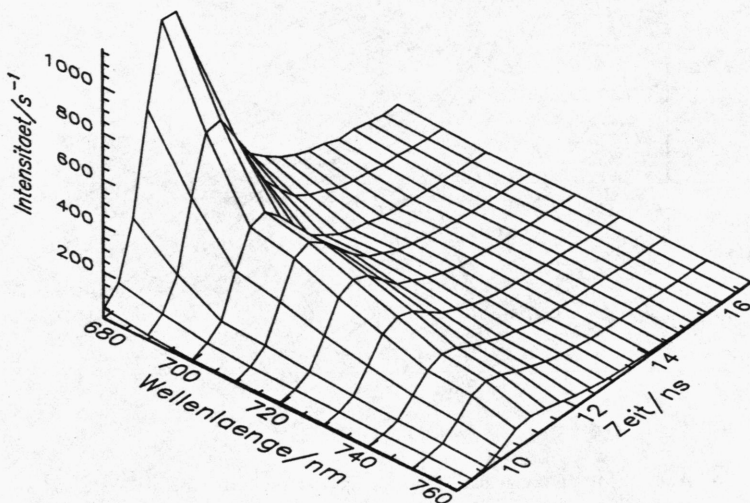


Abb. 6.13: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von oxidierten PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 242 K

Für 242 K liegt das Maximum bei 680 nm. Auf der langwelligen Flanke nimmt die Intensität kontinuierlich bis 700 nm ab. Der darauffolgende Plateaubereich ist deutlich kleiner als bei den Proben ohne Zusätze. Er reicht hier nur bis 710 nm. Danach sinkt die Intensität weiter ab.

Im Vergleich mit den anderen Proben ergibt sich bei dieser Temperatur eine Verminderung der Intensität um den Faktor 10.

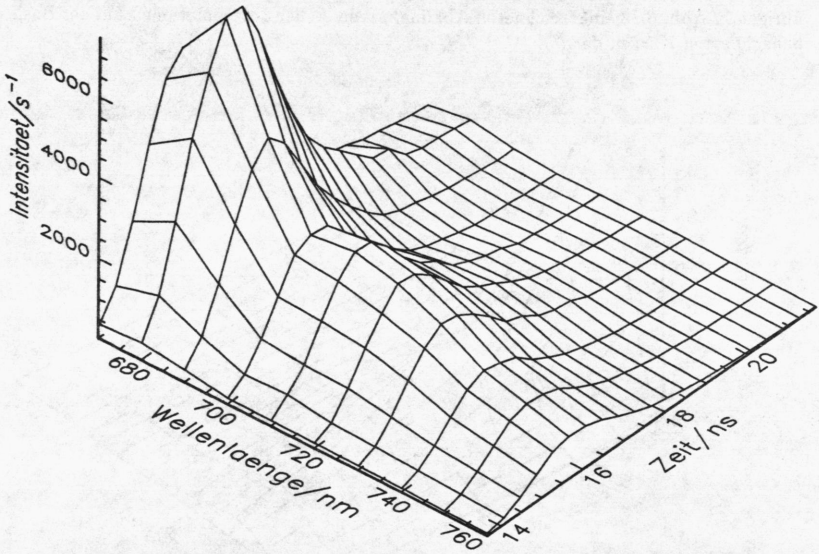


Abb. 6.14: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von oxidierten PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 113 K

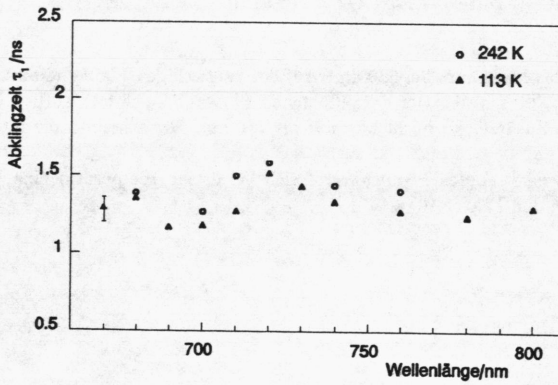


Abb. 6.15: τ_1 von oxidierten PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) bei 242 K und 113 K ($\Delta\tau_1 = \pm 75$ ps)

Bei 113 K wurde ein vollständiger Satz von Abklingkurven gemessen. Abb. 6.14 zeigt in dreidimensionale Darstellung den zeitlichen Verlauf der Emission. Das Maximum ist hier gegenüber den bei anderen Proben gewonnenen Ergebnissen (vgl. ohne Zusätze, bzw. unter reduzierenden Bedingungen) zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Es liegt bei 680 nm, wobei die Kurve bei 670 nm im Gegensatz zu den Messungen bei reduziertem primären Donor eine nur um ca. 10 % geringere Maximalintensität erreicht. Auf der langwelligen Flanke erfolgt ein starker Abfall zwischen 680 und 700 nm. Bei 710 nm ist ein schwach ausgeprägtes Nebenmaximum zu erkennen. Zu längeren Wellenlängen hin (> 710 nm) nimmt die Intensität ab.

Insgesamt gesehen liegen die Intensitäten um ca. einen Faktor 5 unter den entsprechenden der anderen Proben.

Die Maximalwerte der Abklingkurven werden bei allen Wellenlängen zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Eine zeitliche Verschiebung der Kurven gegeneinander, wie bei den anderen Proben, kann hier nicht festgestellt werden.

λ_{em}/nm	670	680	690	700	710	720	730	740	760	780	800
τ_2/ns ($T = 258$ K)	–	3.2	–	3.2	3.2	3.3	–	3.1	3.2	–	–
τ_2/ns ($T = 113$ K)	3.6	3.3	3.1	3.5	3.7	3.7	3.4	3.4	3.2	3.4	3.7

Tabelle 6.3: Abklingzeit τ_2 von oxidierten PS I-Reaktionszentren (*A. variabilis*) in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei zwei Temperaturen ($\Delta\tau_2 = \pm 0.5$ ns)

Die Abklingzeit τ_1 variiert zwischen 1.2 und 1.6 ns (Abb. 6.15). Obwohl die Werte für 242 K über denjenigen bei 113 K liegen, kann im Rahmen der Meßgenauigkeit von einer guten Übereinstimmung gesprochen werden. Bei 720 nm wird in beiden Fällen ein maximaler Wert erreicht (1.6 ns bzw. 1.5 ns). Im Vergleich zu den Abklingzeiten bei der Probe ohne Zusätze fällt die kleinere Schwankungsbreite auf.

Die Werte für die Abklingzeit τ_2 sind in Tab. 6.3 aufgelistet. Ähnlich wie bei den übrigen Proben liegen sie etwa bei 3.5 ns.

6.2.2 Diskussion – Anregungstransfer im Photosystem I

Einfluß des oxidierten primären Donors

Die oxidierten Proben weisen eine im Vergleich zu den anderen Proben stark verminderte Intensität auf. Das Hauptmaximum ist zudem etwas zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Da bei diesen Untersuchungen der primäre Donor im Zustand $P\ 700^+$ vorliegt, kann die Ursache für diese Intensitätsabnahme nicht in einem Quenchingprozeß durch Ladungstrennung liegen. Aus den Messungen muß daher der Schluß gezogen werden, daß der oxidierte primäre Donor eine effektive 'Energiesenke' (Trap) für die Anregungsenergie darstellt. Zum gleichen Ergebnis führten die im Abschnitt 6.1 diskutierten Untersuchungen im ns- und μ s-Zeitbereich.

Diese hohe 'Quenching'-Effizienz im oxidierten Zustand ist nicht nur im PS I zu finden. G. Deinum et al. (1991) fanden bei Fluoreszenzuntersuchungen an Membranen von *Helibacterium chlorum*, daß der primäre Donor $P\ 798$ die Fluoreszenz im oxidierten Zustand besser unterdrückt als im reduzierten. Der gleiche Effekt kann hier beobachtet werden. Bei 242 K vermindert sich die Emissionsintensität um einen Faktor 10, bei 113 K um einen Faktor 5. Ein Einfluß des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat(III) kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch zeigen die im letzten Abschnitt diskutierten Spektren ein identisches Verhalten. Bei diesen erfolgte die Oxidation des primären Donors photochemisch. Eine direkte Beeinflussung des Prozesses durch Kaliumhexacyanoferrat(III) erscheint damit sehr unwahrscheinlich. Um auch eine mögliche Veränderung des Proteins mit dem pH-Wert als Ursache auszuschließen, wurden die Experimente bei zwei pH-Werten (pH 8.1 und pH 10.5) durchgeführt. In allen Fällen ergab sich eine Verminderung der Fluoreszenzintensität. Die hier durchgeführten Experimente erbringen daher den Nachweis, daß der oxidierte primäre Donor $P\ 700^+$ die Fluoreszenz beim Cyanobakterium *A. variabilis* besser unterdrückt als der reduzierte.

In der dreidimensionalen Darstellung der Messung bei 113 K (Abb. 6.14) erkennt man bei 690 nm einen Abfall der Intensität verglichen mit dem Intensitätsverlauf bei den anderen Proben (Blauverschiebung des Maximums bei den oxidierten Proben). Da zudem die Abklingzeit τ_1 an dieser Stelle den minimalen Wert aufweist, d.h. der Anregungstransfer läuft hier sehr schnell ab, handelt es dabei wahrscheinlich um den Wellenlängenbereich, in dem das Absorptionsmaximum von $P\ 700^+$ liegt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von H. Schaffernicht und W. Junge (1981), die zur Erklärung des Fluoreszenzverhaltens bei oxidiertem primären Donor ein Absorptionsmaximum von $P\ 700^+$ im Bereich der Antennen-chlorophylle vorschlugen.

Für die *in vivo*-Situation der Photosysteme stellt diese hohe Quenchingeffizienz möglicherweise einen Schutz vor Photoschädigung des Reaktionszentrums dar (G. Deinum et al., 1991). Die Anregung kann im oxidierten (geschlossenen) Zustand des RZ sehr effektiv abgeleitet werden, ohne unerwünschte, d.h. schädigende Prozesse zu begünstigen. Als weitere Konsequenz ergibt sich, daß *in vivo* zwischen den einzelnen PS I-Einheiten kein Anregungstransfer stattfinden kann, da die hohe Einfangeffizienz der geschlossenen Zentren zu einer Verringerung der Photosyntheserate führen würde. Eine derartige 'Verknüpfung' von Photosynthesezentren wird zur Zeit im Zusammenhang mit Modellen über die Organisation der Zentren in der Membran diskutiert (vgl. dazu Kap. 2.2, 'lake'-Modell). Im Gegensatz dazu schlossen beim PS II L. Valkunas et al. (1992) aus Veränderungen der Fluoreszenzinduktionskurven bei Doppelpulsexperimenten auf einen Anregungstransfer zwischen den einzelnen Zentren im Sinne des 'lake'-Modelles.

Aufbau der Kernantenne im PS I

Das Fluoreszenzverhalten der Proben ohne Zusätze und unter reduzierenden Bedingungen weist folgende gemeinsame Charakteristika auf:

- Die Spektren verändern sich bei unterschiedlichem Ladungszustand des Reaktionszentrums. Das in Abb. 6.7 auftretende Nebenmaximum bei 730 nm ist unter stark reduzierenden Bedingungen bei gleicher Temperatur nicht zu beobachten (Abb. 6.10).
- Das Hauptmaximum der Emission verschiebt sich bei tiefen Temperaturen in den langwelligeren Bereich.
- Der Plateaubereich endet bei 730 nm. Entweder tritt hier noch ein Nebenmaximum auf, oder es erfolgt ein starker Abfall der Intensität.
- Die Abklingzeit τ_1 liegt in der Größenordnung von 1 bis 2 ns.

Ein Vergleich der Abklingzeiten mit den in Kap. 2.4.2 zusammengefaßten Literaturdaten ergibt, daß das in dieser Arbeit untersuchte Fluoreszenzabklingen nicht vom direkten Anregungstransfer in der Antenne zum primären Donor herrührt. Die für diesen Prozeß ermittelten charakteristischen Zeiten liegen zwischen 50 und 100 ps (s. Kap. 2.4.2). Eine Erfassung von derart kurzen Zeiten ist mit der hier benutzten Apparatur nicht möglich. Abklingkomponenten mit charakteristischen Zeiten von einigen 100 ps bis in den ns-Bereich wurden an PS I-Reaktionszentren jedoch auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden (z.B.: T.J. Owens et al., 1988 und 1989; A. R. Holzwarth et al., 1990). Sie werden der Emission aus Antennenkomplexen zugeschrieben, die keine funktionale Verbindung mit dem primären Donor und der Akzeptorkette aufweisen. Die Fluoreszenz kann nicht durch eine Ladungstrennung gequencht werden und klingt daher mit der angenommenen Lebensdauer von Pigment-Protein-Komplexen ab. Eine eingehendere Diskussion dieser Fluoreszenzkomponente, insbesondere Temperaturabhängigkeit oder Einflüsse von Redoxmittel, findet sich in den oben angeführten Arbeiten nicht.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen muß diese Interpretation in Zweifel gezogen werden. Die chemische Reduktion oder Oxidation des primären Donors führt zu Veränderungen der Fluoreszenz, wie die Abb. 6.10 und 6.13 zeigen. Dieses Verhalten ist nicht konsistent mit dem oben erwähnten Modell, da bei einer Abtrennung von primären Donor und Akzeptorkette keine Beeinflussung erfolgen kann.

Bei den Proben ohne Zusätze und mit Natriumdithionit führt außerdem eine Erniedrigung der Temperatur zu einem langsameren Anstiegs- und Abklingverhalten im Bereich 700 bis 720 nm (Abb. 6.8 und 6.11) gegenüber den benachbarten Wellenlängen. Der Energieübertrag auf einen Absorber, der in diesem Bereich emittiert, wird verschlechtert (Temperaturabhängigkeit des Förster-Mechanismus). Bei einem Antennenkomplex ohne Anbindung an den primären Donor wäre eine kontinuierlich zu größeren Wellenlängen hin anwachsende Verlangsamung des Anregungstransfers zu erwarten. Dies kann nicht beobachtet werden. Es muß sich um den Energieübertrag auf ein spezielles Molekül handeln. Nimmt man eine Stokesverschiebung zwischen Absorption und Emission von ca. 5 bis 7 nm an, wie sie z.B. von G. Zucchelli et al. (1992) für Antennenpigmente ermittelt wurde, kann die Emission in diesem Bereich daher der prompten Fluoreszenz aus dem primären Donor zugeschrieben werden. Bei einer Absenkung der Temperatur wird der Anregungstransfer verlangsamt (Förster-Mechanismus), da eine effiziente Ankoppelung des primären Donors an die Antenne nicht mehr gegeben ist. In entsprechender Weise führt dies auch zu einer zeitlichen Verschiebung des Fluoreszenzanstieges.

Daraus folgt, daß die hier untersuchte Fluoreszenz einem Anregungstransfer in funktionell intakten Reaktionszentren zugeschrieben werden muß. Es könnte sich dabei um eine Anregung handeln, die nach einem einmaligem Einfangen am primären Donor, diesen wieder verlassen hat und eine 'random-walk'-Bewegung in der Antenne ausführt. Diese 'random-walk'-Bewegung wird durch die Abklingzeit τ_1 charakterisiert, während die zweite Abklingkomponente (τ_2), analog zur Diskussion im letzten Kapitel, dem Fluoreszenzabklingen von nicht funktionellen Antennensystemen zugeordnet wird. Die an den PS I-Präparationen aus Spinat ermittelten Ergebnisse sind konsistent mit dieser Interpretation. Die größere Anzahl von Antennenpigmenten dieser Proben äußert sich in einer Verlängerung der Abklingzeit τ_1 . Für die in den letzten Jahren geführte Diskussion über den Anregungstransfer im PS I (siehe dazu Kap. 2.2 und die dort zitierten Literaturstellen) ergibt sich damit ein 'traplimitierter' Anregungstransfer im PS I. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Transfer und Einfang einer Anregung ist das 'Trappen' am primären Donor. Danach kann die Anregung in diesem Modell den primären Donor wieder verlassen.

Die zeitaufgelösten Spektren in der Abb. 6.7 geben damit den Transfer der Anregungsenergie innerhalb der Antenne wieder. Das Maximum bei 680 nm kann, wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten diskutiert, der Emission aus der Mehrzahl der Antennenmoleküle zugeordnet werden. Auffällig ist jedoch das Nebenmaximum bei 730 nm. Entsprechend der oben angeführten Stokesverschiebung von ca. 5 - 7 nm kann es nicht vom primären Donor herrühren. Es handelt sich dabei um Fluoreszenz von einem Antennenteil, der energetisch unter dem primären Donor liegt. Die Existenz einer derartigen Antenne wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert (z.B. B.P. Wittmershaus et al., 1987, D.R. Klug et al., 1989; R. Sparrow et al., 1990). In der Arbeitsgruppe von G.R. Fleming wurden Fluoreszenzuntersuchungen im Temperaturbereich von 36 bis 295 K, sowie Simulationen dazu durchgeführt (M. Werst et al., 1992; Y. Jia et al., 1992). Die Simulationsrechnungen führten zu einem Modell, bei dem die Antennenpigmente zufällig im Protein verteilt sind, d.h. keine 'funnel'-Struktur auftritt. Zusätzlich ist noch mindestens ein energetisch tiefer liegendes Antennenmolekül in unmittelbarer Nachbarschaft zum primären Donor notwendig, um die Ergebnisse aus den Fluoreszenzexperimenten simulieren zu können. Für das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gelang B.P. Wittmershaus et al. (1992) der Nachweis, daß eine kleine Gruppe von Pigmenten in der Kernantenne vorkommt, deren energetische Lage unterhalb des primären Donors anzusiedeln ist. Das Fluoreszenzmaximum lag in diesem Fall bei 725 nm.

Nach den hier durchgeführten Experimente weist das PS I von *A. variabilis* einen funktionell analogen Antennenteil auf. Bei 730 nm ist entweder ein Nebenmaximum zu beobachten (Abb. 6.7), oder ein signifikanter Abfall der Intensität zu größeren Wellenlängen hin (Abb. 6.8 und 6.11), d.h. diese Wellenlänge markiert die langwellige Grenze der Antennenemission. Aus dem Fehlen eines Nebenmaximums bei der reduzierten Probe bei 258 K (Abb. 6.10) kann geschlossen werden, daß in diesem Fall der Transfer der Anregungsenergie zum primären Donor mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft wie der Transfer zwischen einzelnen Antennenpigmenten. Die Werte von τ_1 weisen in diesem Fall innerhalb der Meßgenauigkeit eine nur geringe Variation auf. Durch die chemische Reduktion wird sichergestellt, daß vor jedem Laserpuls alle Zentren im reduzierten, d.h. aufnahmebereiten Zustand sind. Bei den Proben ohne Zusätze kann dies nicht für alle Zentren angenommen werden. Wie die entsprechenden Abbildungen zeigen, ist bei diesen Proben zudem die Fluoreszenzintensität niedriger als bei den reduzierten Proben, da oxidierte Reaktionszentren die Fluoreszenz vermindern.

Im Hinblick auf einen effizienten Anregungstransfer hin zum primären Donor erscheint ein Antennenpigment, dessen energetische Lage unter derjenigen von P 700 liegt, wenig sinnvoll. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen über den Antennenaufbau im PS I wird seine 'biologische' Funktion jedoch verständlich. T.G. Owens et al. (1988, 1989) und M. West et al. (1992) konnten aus zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen an PS I-Präparaten mit unterschiedlicher Antennengröße schließen, daß die Anregung innerhalb der Antenne auf einer ps-Zeitskala homogen über die Mehrzahl der Antennenmoleküle verteilt wird. Eine energetische Abstufung der Pigmente hin zum primären Donor ('funnel'-Modell) tritt beim PS I nicht auf. Zum gleichen Ergebnis kamen J.W. Lee et al. (1992) bei Experimenten, in denen sie die Fluoreszenz der Kernantenne von PS I durch die Zugabe verschiedener Chinone als Fluoreszenzquencher variierten. Auch bei den im Kap. 6.1 beschriebenen Fluoreszenzspektren bei 2 K war es nicht möglich, eine Aufspaltung des Maximums bei 680 nm in mehrere Linien zu beobachten, was auf einen sehr effizienten und schnellen Energietransfer in der Antenne schließen läßt.

Eine Gleichverteilung ('Verschmierung') der Anregungsenergie über die gesamte räumliche Ausdehnung der Antenne würde die Trappingwahrscheinlichkeit senken. Durch ein Antennenmolekül, das in unmittelbarer Nähe zum primären Donor sitzt und eine Energiesenke darstellt, kann dies wieder ausgeglichen werden. Unter normalen Bedingungen (Raumtemperatur) reicht die thermische Energie aus, einen effizienten Transfer der Anregung zum primären Donor zu gewährleisten.

Aus dieser Theorie ergibt sich, daß bei einer Verringerung der Temperatur eine Verlängerung der Abklingzeiten auftreten müßte. Wie die Abb. 6.9 und 6.12 zeigen, konnte dies im Experiment beobachtet werden.

Die Variation von τ_1 mit der Wellenlänge führt darüberhinaus zu dem Schluß, daß die 'global analysis'-Methode (J.R. Knutsen et al., 1983) bei der Berechnung der Abklingzeiten nur eine sehr ungenaue Methode darstellt.

Aus der Interpretation von zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren und Abklingzeiten kann damit folgendes Modell für den Anregungstransfer im Kernbereich des Photosystems I aufgestellt werden:

- Die Anregung wird in der Kernantenne des Photosystems I innerhalb von ps über die Mehrzahl der Antennenmoleküle verteilt.
- Das hier untersuchte Fluoreszenzverhalten ist auf den Anregungstransfer in Antennenkomplexen mit funktioneller Anbindung an den primären Donor zurückzuführen.
- Der Anregungstransfer in der Kernantenne von PS I ist traplimitiert. Die Anregung kann den primären Donor wieder verlassen und führt eine 'random-walk'-Bewegung in der Antenne aus.
- Die charakteristische Zeit für diese 'random-walk'-Bewegung liegt für 258 K bei 1 ns.
- In unmittelbarer Nachbarschaft zu P 700 existiert eine kleine Anzahl von Antennenmolekülen, deren energetische Lage unterhalb von P 700 anzusiedeln ist. Diese unterstützen vermutlich den Anregungstransfer zum primären Donor.
- Der oxidierte primäre Donor, P 700⁺, quencht die Fluoreszenz besser als der reduzierte, P 700. Diese Funktion stellt eine Schutzvorrichtung gegen Schädigungen durch überschüssige Anregungsenergien dar.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung der Primärprozesse in den Photosynthesezentren von Pflanzen und Bakterien beitragen. Zu diesem Zweck wurde der Anregungstransfer in den Antennenkomplexen von Photosystem I und Photosystem II mit zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie im ns- und sub-ns-Zeitbereich untersucht. Die beiden Photosysteme können von ihrem Aufbau her als membrandurchragende Pigment-Protein-Komplexe charakterisiert werden. Sie setzen sich aus einem Antennensystem und dem Kernbereich mit primärem Elektronendonator und Akzeptorkette zusammen. Die Energie von eingestrahnten Photonen wird durch die Antennen sehr effektiv zum primären Donor, einem speziellen Chlorophyllmolekül, weitergeleitet. Dieser gibt im angeregten Zustand ein Elektron an ein benachbartes Molekül ab. Zur Stabilisierung der Ladungstrennung wird dieses Elektron auf einer ns-Zeitskala über die Membran hinweg verschoben. Am Ende eines mehrstufigen Prozesses erfolgt die Synthese von NADPH und ATP, die für die übrigen in der Pflanzenzelle ablaufenden Reaktionen benötigt werden.

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird als 'Meßsonde' ein Verlustprozeß bei der Anregungsweiterleitung ausgenutzt. Es kommt daher zu keiner Störung des Untersuchungsobjektes ('non-invasive-method'). Die Messungen wurden durchgeführt an intakten Zellen von *Anabaena variabilis* und *Chlorella vulgaris*, sowie an Chloroplasten und PS I-Präparationen (aus Spinat und *A. variabilis*).

Für die hier vorgesehenen Untersuchungen mußte ein neuer Meßplatz aufgebaut werden. Zur Anregung der Proben wurde ein modengekoppelter Argonionenlaser verwendet. Die Halbwertsbreite der Pulse lag bei < 200 ps. Mit Hilfe eines Cavity-Dumpers konnte die Wiederholrate variiert werden. Bei Messungen unterhalb von 200 K betrug sie 4.1 kHz, ansonsten 41.0 kHz. Die Detektion des Fluoreszenzsignales erfolgte mit einem Photomultiplier. Für die Meßwerterfassung wurde ein Zeit-Amplituden-Konverter mit einem Pulshöhenanalysator benutzt. Die geringe Fluoreszenzintensität der Proben schloß andere Verfahren aus. In Verbindung mit einem bereits bestehenden Meßplatz konnten Prozesse bis in den ms-Zeitbereich untersucht werden.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich auf den folgenden Seiten.

Intakte Systeme (*A. variabilis*, *C. vulgaris* und Chloroplasten)

Nach Anregung mit einem 200 ps-Puls klingt die Fluoreszenz innerhalb von etwa 15 ns bis auf die Nullrate ab. Eine verzögerte Fluoreszenz ist unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen nicht festzustellen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch die Anpassung von zwei Exponentialfunktionen mit den charakteristischen Zeiten τ_1 und τ_2 an das Fluoreszenzabklingen.

Ein Fluoreszenzbeitrag von PS I konnte nicht ermittelt werden. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden umfangreiche Messungen vorgenommen, bei denen der Ladungszustand der Akzeptorkette durch Photosynthesegifte (DCMU) oder Redoxmittel variiert wurde. Bei keiner dieser Messungen war ein Hinweis auf PS I-Fluoreszenz zu entdecken. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente weisen zudem auf eine Temperaturabhängigkeit der Wirkung von DCMU hin.

In Übereinstimmung mit der Literatur wird daher die hier detektierte Emission der Fluoreszenz aus den Antennensystemen von PS II zugeschrieben. Der Anregungstransfer im PS II läßt sich damit folgendermaßen charakterisieren:

- Für die Kernantenne bei *A. variabilis* ergibt sich ein Fluoreszenzmaximum bei 683 nm, während das Nebenmaximum bei ca. 650 nm den Phycobilisomen zuzuordnen ist. Die Spektren von *C. vulgaris* und Chloroplasten weisen nur ein Maximum bei 686 bzw. 684 nm auf. Dies ist auf die Emission aus LHC II und Kernantenne zurückzuführen.
- Im unbeeinflussten Zustand und bei Raumtemperatur gibt τ_1 die Zeit wieder, die für den Einfang eines Photons, die Weiterleitung der Anregung zum primären Donor und die Ladungstrennung benötigt wird. Bei *A. variabilis* beträgt diese Zeit etwa 700 ps, bei *C. vulgaris* und Chloroplasten variiert τ_1 zwischen 600 und 800 ps.
- Durch Abkühlung auf 253 K kommt es zu Veränderungen in der Thylakoidmembran. Bei *A. variabilis* bewirken sie eine schlechtere Ankopplung der Phycobilisomen an den Kernbereich des Photosystems II. Im Spektrum äußert sich dies durch eine Verstärkung des Nebenmaximums. Die Abklingzeit τ_1 vergrößert sich auf Werte von 1.5 ns. Die Chlorella- und Chloroplastenproben weisen keine Veränderungen der Fluoreszenzspektren bei Abkühlung auf. Dies kann nur dahingehend interpretiert werden, daß hier LHC II und Kernantenne im PS II spektral gleich aufgebaut sind.
- Aus ESR-Experimenten konnten F.J.E. van Mieghem et al. (1989) schließen, daß eine Reduktion des Akzeptors Q_A zu einer Behinderung der Ladungstrennung im PS II führt. Diese Reduktion kann sowohl mit Natriumdithionit als auch durch die Blockierung des Elektronentransfers an Q_B mit DCMU erreicht werden. Da die Ladungstrennung als effektiver Quenchingprozeß wegfällt, sind ein Anwachsen der Fluoreszenzintensität auf den F_{max} -Wert und eine Verlängerung der Abklingzeit zu erwarten. Beides wurde hier im Experiment beobachtet. Damit kann die von F.J.E. van Mieghem et al. (1989) aufgestellte Theorie bestätigt werden.
- Die hier ermittelte lange Abklingzeit τ_2 in der Größenordnung von einigen ns läßt sich bei Cyanobakterien, Grünalgen und Chloroplasten als prompte Fluoreszenz von nicht angebundenen Antennenkomplexen identifizieren. In Abhängigkeit von der Präparation ergibt sich bei Chloroplasten ein von freiem Chlorophyll herrührender Fluoreszenzanteil.

Photosystem I – Präparationen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fluoreszenzverhalten von PS I-Präparationen zwischen 670 und 800 nm im Temperaturbereich 2 K bis 285 K untersucht. Die Fluoreszenzintensität fällt innerhalb von 25 ns nach einer Anregung auf die Nullrate ab. Die Anpassung des Abklingens erfolgte, analog zum Vorgehen bei den intakten Systemen, mit zwei Exponentialfunktionen (τ_1 und τ_2). Die wesentlichen experimentellen Ergebnisse sind:

- PS I-Präparationen von Spinat und *A. variabilis* wiesen die gleichen spektralen Charakteristika auf. Das Maximum der Fluoreszenz liegt im unbeeinflussten Zustand bei 680 nm. Es ist auf die Emission aus der Kernantenne zurückzuführen.
- Eine verzögerte Fluoreszenz kann bei keiner der Proben beobachtet werden. Die Untersuchungen wurden dazu mit Anregungspulsen von unterschiedlicher Länge bis in den Zeitbereich von 0.5 ms ausgedehnt. Zur Erklärung wird ein Modell vorgeschlagen, bei dem die Rekombination nach einer Ladungstrennung nicht über einen angeregten P 700*-Zustand erfolgt, sondern zu einem 1P 700-Zustand führt. Dessen Übergang in den Grundzustand konnte nicht beobachtet werden, da er im Infraroten erfolgt.
- Eine Analyse der zeitaufgelösten Spektren bei verschiedenen Redoxzuständen der Proben ergibt: die hier beobachtete Emission muß, im Gegensatz zu bisherigen Zuordnungen, der Fluoreszenz aus Antennensystemen mit funktionierender Anbindung an den primären Donor P 700 zugeschrieben werden.
- Durch die Anregung mit einem 15 ns-Laserpuls werden alle in der Probe befindlichen Reaktionszentren oxidiert. Der Einfluß der oxidierten Reaktionszentren führt zu einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums um 4 nm auf 676 nm. Die relative Intensität im roten Spektralbereich (700 bis 750 nm) ist gegenüber reduzierten Proben vermindert. Auch eine chemische Oxidation der Proben mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ergibt diese Verschiebung.
Die oxidierten Proben weisen darüberhinaus eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität auf. Dies kann in Übereinstimmung mit Ergebnissen an *Helibacterium chlorum* (G. Deinum et al., 1991) durch ein effizientes Quenchen der Fluoreszenz durch den oxidierten primären Donor erklärt werden.
- Bei reduziertem primären Donor kann ein Antennenpigment beobachtet werden, dessen energetische Lage unter der von P 700 liegt.

Aus der Interpretation von zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren und Abklingzeiten kann damit folgendes Modell für den Anregungstransfer im Kernbereich des Photosystems I aufgestellt werden:

- Die Anregung wird in der Kernantenne des Photosystems I innerhalb von ps über die Mehrzahl der Antennenmoleküle verteilt.
- Der Anregungstransfer in der Kernantenne von PS I ist traplimitiert. Die Anregung kann den primären Donor wieder verlassen und führt eine 'random-walk'-Bewegung in der Antenne aus.
- Die charakteristische Zeit für diese 'random-walk'-Bewegung liegt für 258 K bei 1 ns.
- In unmittelbarer Nachbarschaft zum primären Donor befindet sich eine kleine Anzahl von Antennenmolekülen, deren energetische Lage unterhalb von P 700 anzusiedeln ist. Diese unterstützen vermutlich den Anregungstransfer zum primären Donor.

- Der oxidierte primäre Donor, P 700⁺, quencht die Fluoreszenz besser als der reduzierte, P 700. Diese Funktion stellt eine Schutzvorrichtung gegen Schädigungen durch überschüssige Anregungsenergien dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transfer von Anregungsenergie in den Antennensystemen von Photosystem I und Photosystem II untersucht. Dabei wurde das Fluoreszenzverhalten von Photosystem I zum ersten Mal in einem ausgedehnten Wellenlängen- und Temperaturbereich charakterisiert. Auf der Grundlage dieser Messungen konnte ein Modell für den Anregungstransfer in der Kernantenne erstellt werden. In weiterführenden Experimenten kann nun die Gültigkeit dieses Modelles für andere PS I - artige Reaktionszentren überprüft werden.

Kapitel 8

Literaturverzeichnis

- Andersson, B., und Anderson, J.M. (1980)
Biochim. Biophys. Acta **593**, 427-440
- Agostiano, A., Butcher, K.A., Showell, M.S., Gotch, A.J., und Fong, F.K. (1987)
Chem. Phys. Lett. **137**, 37-41
- Barber, J., Chapman, D.J., und Telfer, A. (1987)
FEBS Lett. **220**, 67-73
- Barber, J. (1989)
in: 'Photoconversion Processes for Energy and Chemicals' (Hall, D.O., und Grassi, G., eds.), 172-184, Elsevier Science Publ., London
- Bearden, A.J., und Malkin, R. (1972)
Biochim. Biophys. Acta **283**, 456-468
- Biggins, J. und Mathis, P. (1988)
Biochemistry **27**, 1494-1500
- Bixon, M., Jortner, J., Michel-Beyerle, M.E., Ogrodnik, A., und Lersch, W. (1987)
Chem. Phys. Lett. **140**, 626-630
- Bocian, D.F., Boldt, N.J., Chadwick, B.W., und Frank, H.A. (1987)
FEBS Lett. **214**, 92-96
- Brettel, K. (1989)
Biochim. Biophys. Acta **976**, 246-249
- Brettel, K. (1990)
in: 'Current Research in Photosynthesis' (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. II, 627-630
Kluwer Academic Publ., Dordrecht
- Boardman, N.K., Thorne, S.W., und Anderson, S.W. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **56**, 586-593
- Bottin, H., und Sétif, P. (1991)
Biochim. Biophys. Acta **1057**, 331-336

- Borisov, A.Y. (1989)
Photosynth. Res. **20**, 35-58
- Burnap, R.L., und Sherman, L. (1991)
Biochemistry **30**, 440-446
- Butler, W.L. (1978)
Annu. Rev. Plant Physiol. **29**, 345
- Cammack, R., und Evans, M.C.W. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **67**, 544-549
- Canaani, O., Schuster, G., und Ohad, I. (1989)
Photosynth. Res. **20**, 129-146
- Chitnis, P.R., und Thornber, J.P. (1988)
Photosynth. Res. **16**, 41-63
- Connolly, J.S., Janzen, A.F., und Samuel, E.B. (1982)
Photochem. Photobiol. **36**, 559-563
- Deinum, G., Kramer, H., Aartsma, T.J., Kleinherenbrink, F.A.M., und Ames, J. (1991)
Biochim. Biophys. Acta **1058**, 339-344
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., und Michel, H. (1984)
J. Mol. Biol. **180**, 385-398
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., und Michel, H. (1985)
Nature **318**, 618-624
- Dexter, D.L. (1953)
J. Chem. Phys. **21**, 836-850
- Di Bartolo, B. (1984)
 in: 'Energy Transfer Processes in Condensed Matter' (Di Bartolo, B., ed.), 103-204
 Plenum Press, New York
- DIN (1986)
 Bestimmung des Chl a-Gehaltes von Oberflächenwasser
 Verfahren DIN 38412-L16, Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin
- Eckert, H.J., und Renger, G. (1988)
FEBS Lett. **236**, 425-431
- Emerson, R., und Arnold, W. (1932)
J. gen. Physiol. **16**, 191
- Evans, M.C.W., Sihra, C.K., Bolton, J.R., und Cammack, R. (1975)
Nature **256**, 668-670
- Förster, Th. (1949)
Z. Naturforsch. **4a**, 321-327
- Foguel, D., Chaloub, R.M., Silva, J.L., Crofts, A.R., und Weber, G. (1992)
Biophys. J. **63**, 1613-1622
- Ford, R.C., Picot, D., und Garavito, R.M. (1987)
EMBO Journal **6**, 1581-1586

- Fujii, T., Yokoyama, E., Inoue, K., und Sakurei, H. (1990)
Biochim. Biophys. Acta **1015**, 41-48
- Garnier, J., Maroc, J., und Guyon, D. (1986)
Biochim. Biophys. Acta **851**, 395-406
- Goedheer, J.C. (1964)
Biochim. Biophys. Acta **88**, 304-317
- Golbeck, J.H., und Cornelius, J.M. (1986)
Biochim. Biophys. Acta **849**, 16-24
- Golbeck, J.H., McDermot, A.E., Jones, W.K., und Kurtz, D.M. (1987)
Biochim. Biophys. Acta **891**, 94-98
- Golbeck, J.H. (1988)
Biochim. Biophys. Acta **895**, 167-204
- Golbeck, J.H., und Bryant, D.A. (1991)
Curr. Topics Bioenerg. **16**, 83-177
- Govindjee (1990)
Photosynth. Res. **25**, 151-160
- van Grondelle, R. (1985)
Biochim. Biophys. Acta **811**, 147-195
- Haagland, D.R., und Snider, W.C. (1933)
Amer. Soc. horticult. Sci. **30**, 288
- Haehnel, W., Holzwarth, A.R., und Wendler, J. (1983)
Photochem. Photobiol. **37**, 435-443
- Hanley, J.A., Kear, J., Bredenkamp, G., Li, G., Heathcote, P., und Evans, M.C.W. (1992)
Biochim. Biophys. Acta **1099**, 152-156
- Heimerl, F.S. (1977)
 Staatsexamensarbeit, Universität Regensburg
- Hiyama, T., und Ke, B. (1972)
Biochim. Biophys. Acta **267**, 160-171
- Hiyama, T., Watanabe, T., Kobayashi, M., und Nakazato, M. (1987)
FEBS Lett. **214**, 97-100
- Hodges, M., und Moya, I. (1986)
Biochim. Biophys. Acta **849**, 193-202
- Holland, E. (1991)
 Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Holzappel, W., Finkle, U., Kaiser, W., Oesterheld, D., Scheer, H., Stolz, H.U., und Zinth, W. (1989)
Chem. Phys. Lett. **160**, 1-7
- Holzwarth, A.R. (1987)
 in: 'Progress in Photosynthesis Research' (Biggens, J., ed.), Vol. I, 53-60
 Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht

- Holzwarth, A.R., Haehnel, W., Ratajczak, R., Bittersmann, E., und Schatz, G.H. (1990)
in: 'Current Research in Photosynthesis' (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. II, 611-614
Kluwer Acad. Publ., Dordrecht
- Hodges, M., Moya, I., Briantais, J.-M., und Remy, R. (1987)
in: 'Progress in Photosynthesis Research' (Biggens, J., ed.), Vol. I, 115-118
Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht
- Ikegami, I. (1976)
Biochim. Biophys. Acta **449**, 245-258
- Itoh, S., Iwaki, M., und Ikegami, I. (1987)
Biochim. Biophys. Acta **893**, 508-516
- Itoh, S., und Iwaki, M. (1988)
Biochim. Biophys. Acta **934**, 32-38
- Izawa, S. (1977)
in: 'Encyclopedia of Plant Physiology, New Series'
(Trebst, A., Avron, M., eds.), **5**, 266-282
Springer-Verlag, Berlin
- Jansson, P.A. (1984)
'Deconvolution', Academic Press, Inc., Orlando
- Jia, Y., Jean, J.M., Werst, M.M., Chan, C.-K.,
und Fleming, G.R. (1992)
Biophys. J. **63**, 259-273
- Joliot, P., und Joliot, A. (1968)
Biochim. Biophys. Acta **153**, 625-634
- Katz, J.J., Bowman, M.K., Michalski, T.J., and Worcester, D.L. (1991)
in: 'Chlorophylls' (Scheer, H., ed.), 211-235
CRC Press, Boca Raton 1991
- Kellog, E.C., Kalaczowsky, S., Wasielewski, M.R., und Tiede, D.M., (1989)
Photosynth. Res. **22**, 47-59
- Kingma, H., van Grondelle, R., und Duysens, L.N.M. (1985)
Biochim. Biophys. Acta **808**, 383-399
- Kirk, J.T.O. (1968)
Planta **78**, 200-207
- Klimov, V.V. (1984)
in: 'Advances in Photosynthesis Research' (Sybesma, C., ed.), Vol. 1, 131-138
Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht
- Klug, D.R., Giorgi, L.B., Crystall, B., Barber, J., und Porter, G. (1989)
Photosynth. Res. **22**, 277-284
- Knight, A.E.W., und Selinger, B.K. (1973)
Aust. J. Chem. **26**, 1-27
- Knutsen, J.R., Beechem, J.M., und Brand, L. (1983)
Chem. Phys. Lett. **102**, 501-507

- Kok, B. (1956)
Biochim. Biophys. Acta **22**, 399-401
- Kok, B., Forbush, B., und McGloin, M. (1970)
Photochem. Photobiol. **11**, 457-475
- Kopelman, R. (1976)
 in: 'Radiationless Processes in Molecules and Condensed Matter'
 (Fong, F.K., ed.), 297-348, Springer-Verlag, Berlin
- Kraus, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z.,
 Betzel, C., Wilson, K.S., Witt, H.T., und Saenger, W. (1993)
Nature **361**, 326-331
- Krause, H. (1986)
 Dissertation, Universität Regensburg
- Lee, J.W., Zipfel, W., und Owens, T.G. (1992)
J. Luminescence **51**, 79-89
- Leibl, W., Breton, J., Deprez, J., und Trissl, H.-W. (1989)
Photosynth. Res. **22**, 257-275
- Lockau, W., Schoeder, H.-U., Nitschke, W., und Ziegler, K. (1987)
 in: 'Progress in Photosynthesis Research' (Biggins, J., ed.), Vol. II, 37-40
 Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht
- Malkin, R., und Bearden, A.J. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 16-19
- Marder, J.B., und Barber, J. (1989)
Plant, Cell and Environment **12**, 595-614
- Marsho, T.V., und Kok, B. (1980)
Methods Enzymol. **69**, 280-289
- Mathis, P., und Rutherford, A.W. (1987)
 in: 'Photosynthesis' (Amesz, J., ed.), Vol. 15, 63-96
 Elsevier Science Publ., Amsterdam
- Mathis, P., und Sétif, P. (1988)
FEBS Lett. **239**, 93-98
- McDermott, A.E., Yachandra, V.K., Guiles, R.D., Sauer, K., Klein, M., Parret, K.,
 und Golbeck, J.H. (1989)
Biochemistry **28**, 8056-8059
- Michel-Beyerle, M.E., Plato, M., Deisenhofer, J., Michel, H., Bixon, M.,
 und Jortner, J. (1988)
Biochim. Biophys. Acta **932**, 52-70
- van Miegheem, F.J.E., Nitschke, W., Mathis, P., und Rutherford, A.W. (1989)
Biochim. Biophys. Acta **977**, 207-214
- van Miegheem, F.J.E., Satoh, K., und Rutherford, A.W. (1991)
Biochim. Biophys. Acta **1058**, 379-385

- Mimuro, M., Yamazaki, I., Tamai, N., Yamazaki, T., und Fujita, Y. (1987)
in: 'Primary Processes in Photobiology' (Kobayashi, T., ed.), 23-32
Springer-Verlag, Berlin
- Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maison, B., Boussac, A.
und Etienne, A.-L. (1987)
Biochim. Biophys. Acta **890**, 151-159
- Mohr, H., und Schopfer, P. (1985)
'Lehrbuch der Pflanzenphysiologie', 3. Aufl., Springer Verl., Berlin
- Murrel, J.N. (1967)
Elektronenspektren organischer Moleküle, Mannheim 1967
- Nabedryk, E., Leonhard, M., Mäntele, W., und Breton, J. (1990)
Biochemistry **29**, 3242-3247
- Nitschke, W., Feiler, U., und Rutherford, A.W. (1990)
Biochemistry **29**, 3834-3842
- Nitschke, W., und Rutherford, A.W. (1991)
Trends Biochem. Sci. **16**, 241-245
- Obermeier, P. (1990)
Software-Paket für Messung und Auswertung von Abklingkurven
Universität Regensburg, Fachbereich Physik
- O'Malley, P.J., und Babcock, G.T. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1098-1101
- Owens, T.G., Webb, S.P., Mets, L., Alberte, R.S., und Fleming, G.R. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 1532-1536
- Owens, T.G., Webb, S.P., Alberte, R.S., Mets, L., und Fleming, G.R. (1988)
Biophys. J. **53**, 733-745
- Owens, T.G., Webb, S.P., Mets, L., Alberte, R.S., und Fleming, G.R. (1989)
Biophys. J. **56**, 95-106
- Petersen, J., Stehlik, D., Gast, P., und Thurnauer, M. (1987)
Photosynth. Res. **14**, 15-29
- Petrouleas, V., Brand, J.J., Parret, K.V., und Golbeck, J.H. (1989)
Biochemistry **28**, 2980-2983
- Praktikumsanleitung B/1 - Block (1991)
Pflanzenphysiologie, Biochemische Richtung
Fachbereich Biologie, Universität Regensburg
- Probst, M. (1991)
Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Raven, P.H., Evert, R.F., und Curtis, H. (1988)
Biologie der Pflanzen, 2. verbesserte Aufl.,
de Gruyter-Verlag, Berlin

- Reilly, P., und Nelson, N. (1988)
Photosynth. Res. **19**, 73-84
- Renger, G. (1992)
 in 'The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology'
 (Barber, J. ed.), 45-99, Elsevier Science Publ., Amsterdam,
- Richter, G. (1981)
 Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 4. überarb. und erw. Aufl.
 Thieme Verl., Stuttgart
- Riedel, A. (1991)
 Dissertation, Universität Regensburg
- Robinson, G.W. (1967)
Brookhaven Symp. Biol. **19**, 16-45
- Rojas, G., und Douglas, M. (1987)
Chem. Phys. Lett. **102**(5), 399-403
- Rutherford, A.W., und Mullet, J.E. (1981)
Biochim. Biophys. Acta **635**, 225-269
- Rutherford, A. W., und Inoue, Y. (1984)
FEBS Lett. **165**, 163-170
- Rutherford, A.W., und Heathcote, P. (1985)
Photosynth. Res. **6**, 295-316
- Rutherford, A.W., und Sétif, P. (1990)
Biochim. Biophys. Acta **1019**, 128-132
- Rutherford, A.W., Zimmermann, J.-L., und Boussac, A. (1992)
 in 'The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology'
 (Barber, J. ed.), 179-229, Elsevier Science Publ., Amsterdam,
- Sakurai, H., und San Pietro, A. (1985)
J. Biochem. **98**, 69-76
- Sakurai, H., Inoue, K., Fujii, T., und Mathis, P. (1991)
Photosynth. Res. **27**, 65-71
- Schaffernicht, H., und Junge, W. (1981)
Photochem. Photobiol. **34**, 223-232
- Schatz, G.H., und Holzwarth, A.R. (1986)
Photosynth. Res. **10**, 309-318
- Schatz, G.H., Brock, H., und Holzwarth, A.R. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **54**, 397-405
- Schoeder, H.-U. (1983)
 Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Schoeder, H.U., und Lockau, W. (1986)
FEBS Lett. **199**, 23-27

- Sétif, P., Mathis, P., und Vänngard, T. (1984)
Biochim. Biophys. Acta **767**, 404-414
- Sétif, P., und Bottin, H. (1989)
Biochemistry **28**, 2689-2697
- Sétif, P., und Brettel, K. (1990)
Biochim. Biophys. Acta **1020**, 232-238
- Siggel, U. (1991)
in: 'Sonnenenergie – Herausforderung für Forschung, Entwicklung
und internationale Zusammenarbeit' (Forschungsbericht 1 der Akademie der
Wissenschaften zu Berlin, Gierer, A., ed.), 85-135
Walter de Gruyter-Verlag, Berlin
- Smith, P.W. (1970)
Proc. IEEE **58**, 1342-1357
- Sparrow, R., Brown, R.G., Evans, E.H., und Shaw, D. (1990)
J. Photochem. Photobiol., B: Biology **5**, 445-455
- Stryer, L. (1988)
Biochemistry, 3rd ed., W.H. Freeman and Company, New York
- Terzaghi, W.B., Fork, D.C., Berry, J.A., und Field, C.B. (1989)
Plant Physiol. **91**, 1494-1500
- Thorner, J.P., Cogdell, R.G., Pierson, B.K., und Seftor, R.E.B. (1983)
Journal of Cell Biochemistry **23**, 159-169
- Trissl, H.-W., Leibl, W., Deprez, J., Dobek, A., und Breton, J. (1987)
Biochim. Biophys. Acta **893**, 320-332
- Trumpower, B.L. (1990)
Microbiol. Rev. **54**, 101-129
- Valkunas, L., Geacintov, N.E., und France, L.L. (1992)
J. Luminescence **51**, 67-78
- Wachtveitl, J., Krause, H., und Gebhardt, W. (1987)
Arch. Hydrobiol. Beih. **29**, 37-45
- Warburg, O. (1919)
Biochem. Z. **100**, 230-270
- Warden, J.T., und Golbeck, J.H. (1986)
Biochim. Biophys. Acta **849**, 25-31
- Warren, P.V., Golbeck, J.H., und Warden, J.T. (1993)
Biochemistry **32**, 849-857
- Wasielewski, M.R., Norris, J.R., Shipman, L.L., Lin, C.P., und Svec, W.A. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2957-2961
- Wasielewski, M.R., Johnson, D.G., Seibert, M., und Govindjee (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 524-528

- Weber, Herzinger (1972)
'Laser, Grundlagen und Anwendungen', Physik-Verlag
- Werst, M., Jia, Y., Mets, L., und Fleming, G.R. (1992)
Biophys. J. **61**, 868-878
- Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G., und Simon, M.I. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7303-7307
- Witt, H.T., Schlodder, E., Brettel, K., und Saygin, Ö. (1986)
Photosynth. Res. **10**, 453-471
- Witt, I., Witt, H.T., Gerken, S., Saenger, W., Dekker, J.P., und Rögner, M. (1987)
FEBS Lett. **221**, 260-264
- Wittmershaus, B.P., Berns, D.S., und Huang, C. (1987)
Biophys. J. **52**, 829-836
- Wittmershaus, B.P., Woolf, V.M., und Vermaas, W.F.J. (1992)
Photosynth. Res. **31**, 75-87
- Woese, C.R. (1987)
Microbiol. Rev. **51**, 221-271
- Wünsch, F. (1987)
Software-Paket für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie
Universität Regensburg, Fachbereich Physik
- Youvan, D.C., Alberti, M., Begusch, H., Bylina, E.J., und Hearst, J.E. (1984a)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 189-192
- Youvan, D.C., Bylina, E.J., Alberti, M., Begusch, H., und Hearst, J.E. (1984b)
Cell **37**, 949-957
- Ziegler, K., Lockau, W., und Nitschke, W. (1987)
FEBS Lett. **217**, 16-20
- Zinth, W., Nuss, M.C., Franz, M.A., Kaiser, W., und Michel, H. (1985)
in: 'Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria'
(Michel-Beyerle, M.E., ed.), 286-291, Springer-Verlag, Berlin
- Zucchelli, G., Jennings, R.C., und Garlaschi, F.M. (1992)
Biochim. Biophys. Acta **1099**, 163-169

A

Anhang

A.1 Puffer und Medien

Knop'sche Nährlösung

KNO ₃	0.4 g/l
Ca(NO ₃) ₂	0.1 g/l
MgSO ₄	0.1 g/l
KH ₂ PO ₄	0.1 g/l
KCl	0.1 g/l
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	4.0 mg/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
(nach W.R. Haagland und W.C. Snider, 1933)	

Agar-Platten

Die Agar-Platten wurden mit Knop'scher Nährlösung und 2 % Agar Agar hergestellt.

Lösung Iso-Stack

Angaben für 500 ml Lösung:

0.4	M	Saccharose
30	mM	Tricin
10	mM	NaCl
5	mM	MgCl ₂

Die Lösung wird mit KOH (1 n) auf pH 7.8 eingestellt.

TT-Puffer

20 mM Tris-Puffer pH 8.1 (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, mit HCl eingestellt) mit 0.1 % Triton X 100

A.2 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll
Chl	Chlorophyll
DCMU	3(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (Diuron)
FeS-Zentrum	Eisen-Schwefel-Zentrum
F_X, F_A, F_B	terminale Akzeptoren im PS I (FeS-Zentren)
kDa	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex (light harvesting complex)
MW	Molekulargewicht
NADPH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
P 680 / P 700	primärer Donor im PS I bzw. PS II
PS I / PS II	Photosystem I / II
Q_A / Q_B	terminale Akzeptoren im PS II (Chinone)
RZ	Reaktionszentrum

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. W. Gebhardt bedanke ich mich für die überaus interessante Themenstellung und die vielfältigen Diskussionsmöglichkeiten. Seine Bereitschaft, ein 'grünes' Thema zu unterstützen, ermöglichte diese Arbeit erst.

Herrn Prof. Dr. W. Lockau und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank. Sie bewiesen große Geduld bei dem Versuch, einem 'Physiker' eine Ahnung von 'Biologie' zu vermitteln. Dr. Karl Ziegler stellte zudem eine seiner wertvollen PS I-Präparationen zur Verfügung. Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Hauska vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, sowie bei den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, für die Unterstützung bei den biochemischen Präparationen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. W. Nitschke für seine Hilfestellung und die Zeit, die er sich nahm (auch wenn er eigentlich keine hatte). Die Diskussionen mit ihm und seinen Kollegen am CEN de Saclay trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mit Herrn Markus Probst, Frau Beate Glatzenberger und Frau Ute Klotzbücher ergaben sich im Rahmen ihrer Diplomarbeiten viele interessante Diskussionen.

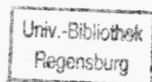
Herr Dr. P.E. Obermaier stellte mir das Fitprogramm für die Abklingkurven zur Verfügung. Einen Teil der Geräte konnte ich bei Herrn Dr. U. Happek, sowie den Mitarbeitern am Lehrstuhl für Physikalische Chemie ausleihen.

Bei ihnen allen bedanke ich mich.

Herr Dr. F.R. Wünsch und Herr Dr. F.J. Wittl unterstützten diese Arbeit in vieler Hinsicht. Für die langen Gespräche und die nicht nur fachlichen Hilfestellungen ein herzliches Dankeschön!

Mein Dank gilt auch meiner Mutter und meinem Vater, der sich sicherlich über diese Arbeit gefreut hätte, für ihre Unterstützung, sowie meiner Freundin Johanna Küffner für ihre Hilfe und die Geduld, die sie in den letzten Monaten mit mir hatte.

Ich bedanke mich auch bei den hier nicht namentlich genannten Freunden und Kollegen, die mir während der Arbeit fachlich und moralisch behilflich waren.



Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Regensburg, den 01.07.93